



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MARIA GILNARA LIMA BANDEIRA

BIOCONSERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO COALHO ELABORADO
COM NISINA

LIMOEIRO DO NORTE

2015

MARIA GILNARA LIMA BANDEIRA

BIOCONSERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO COALHO
ELABORADO COM NISINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Ceará Campus Limoeiro do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dra. Marlene Nunes Damaceno

LIMOEIRO DO NORTE

2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA IFCE
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE**

DIS
B214b

Bandeira, Maria Gilnara Lima.

Bioconservação e caracterização do queijo coalho elaborado com nisina / Maria Gilnara Lima Bandeira. – Limoeiro do Norte, 2015.
70 fls.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, *Campus* Limoeiro do Norte, 2015.

"Orientação: Prof.^a Dra. Marlene Nunes Damaceno".
Referências.

1. Queijo Coalho. 2. Nisina. 3. Bactérias - Contaminação. 4. Eletroforese.
I. Damaceno, Marlene Nunes. II. Título.

CDD 637

MARIA GILNARA LIMA BANDEIRA

BIOCONSERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO COALHO
ELABORADO COM NISINA

- Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Ceará Campus Limoeiro do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 29/07/2015

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Marlene Nunes Damaceno (Orientadora)
Instituto Federal do Ceará, Campus Limoeiro do Norte



Prof. Dra. Ariosvana Fernandes Lima
Instituto Federal do Ceará, Campus Limoeiro do Norte



Prof. Dra. Sandra Maria Lopes dos Santos
Instituto Federal do Ceará, Campus Limoeiro do Norte

À minha família, em especial minha mãe, por
todo amor, apoio, ajuda e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me conceder força, esperança, fé e sabedoria, não só na conclusão deste trabalho, mas em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe, D. Fátima, por sempre acreditar em mim e ser minha fortaleza. Com seu amor incondicional nunca me deixou desistir. Minha eterna gratidão!

Aos meus familiares, pelos momentos bons que me proporcionaram durante toda minha vida e por serem minha inspiração na batalha diária.

Ao meu namorado, Diego, meu companheiro nas horas difíceis e por entender minha ausência quando necessária. Pelo amor e carinho oferecido.

A minha orientadora, Dra. Marlene, que foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho, com suas sábias sugestões e orientações, sempre disposta a ajudar.

As minhas colegas de turma, fundamentais para enriquecer meu aprendizado durante o Mestrado. Em especial Anakláudia, que se tornou uma amiga para a vida toda.

Aos ICs Jonatas e Wecton, que me ajudaram durante todo o experimento, sem eles meus dias seriam mais longos e os experimentos mais laboriosos. Obrigada pelos momentos de descontração proporcionados.

Aos meus colegas da graduação, que me apoiaram e me incentivaram. Em especial Laís, Wesley e Camila, que me deram força nos momentos mais difíceis, não me deixando fraquejar.

A Jean Berg, orientador da graduação, e Rociene, pelo conhecimento prático repassado, devo à vocês meus conhecimentos laboratoriais.

A todo corpo docente do Mestrado, por construir conosco o conhecimento necessário para nos tornarmos boas Mestres.

Aos técnicos de laboratório Auriana, Jorge, Mayra e Juju, que tanto auxiliaram no desenvolvimento da parte prática da pesquisa. Serei eternamente grata.

A todos os professores que me ensinaram em algum momento da minha vida, pois sem eles, hoje eu nada seria. Meu eterno obrigada.

A CAPES e FUNCAP pelo auxílio financeiro durante o curso.

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar em outro lugar o que ela não nos pode dar.”

Sigmund Freud

RESUMO

A bioconservação é um método que consiste na aplicação de agentes antimicrobianos naturais com o intuito de inibir a proliferação de micro-organismos e assim prolongar a vida útil dos produtos alimentícios. Dentre os antimicrobianos naturais, a nisina tem recebido maior atenção por se tratar de uma bacteriocina capaz de inibir ou reduzir o crescimento de alguns micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da nisina na contagem microbiana, nas características físico-químicas, sensoriais e no padrão protéico do queijo coalho. Elaboraram-se quatro formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina, sendo F0 (sem adição de nisina), F1 (3,0 mg.kg⁻¹ de nisina), F2 (6,0 mg.kg⁻¹ de nisina) e F3 (12,5 mg.kg⁻¹ de nisina), estes foram caracterizados através das análises físico-químicas (pH, acidez, umidade, gordura, gordura no extrato seco, proteínas, cinzas, cloretos e cor), microbiológicas (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, Coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas), sensoriais (teste de diferença e aceitação) e por eletroforese SDS-PAGE. Os queijos adicionados de nisina não apresentaram diferenças do controle para os parâmetros umidade, gordura, proteínas e cloretos. O trabalho corroborou a ineficiência da nisina em bactérias gram negativas através do crescimento de coliformes totais durante o período de armazenamento dos queijos elaborados. Não foram observadas a presença bactérias *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, como preconizados na legislação. A nisina foi eficiente no controle de *S. aureus*, mantendo-os dentro dos limites preconizados pela legislação até os 14 dias de fabricação, no controle de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas. A nisina alterou a textura dos queijos coalho, observada através do teste sensorial de diferença. A análise sensorial também apontou maior aceitabilidade para o queijo coalho adicionado de nisina. O perfil eletroforético foi alterado pela adição de nisina, mostrando proteínas com maior peso molecular na formulação controle.

Palavras-chave: Bactérias. Contaminação. Conservação. Eletroforese. Sensorial.

ABSTRACT

The biopreservation is a method consisting of the application of natural antimicrobial agents in order to inhibit the proliferation of microorganisms and thus extend the shelf life of food products. Among the natural antimicrobial nisin has received increased attention because it is a bacteriocin able to inhibit or reduce the growth of some microorganisms. The objective of this study was to evaluate the effect of nisin in microbial count in the physical and chemical characteristics, sensory and *padão* protein curd cheese. We developed four curd cheese formulations with different concentrations of nisin, and F0 (no addition of nisin), F1 (3.0 mg.kg nisin⁻¹), F2 (6.0 mg.kg nisin⁻¹) and F3 (12.5 mg.kg⁻¹ nisin), these were characterized by the physical and chemical analysis (pH, acidity, moisture, fat, fat in dry matter, protein, ash, chlorides and color), microbiological (*Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, and total coliform, *Staphylococcus aureus*, mesophilic aerobic bacteria and lactic acid bacteria), sensory (difference test and acceptance), and by SDS-PAGE. Cheese added nisin showed no differences to control the humidity parameters, fat, protein and chlorides. The work confirmed the ineffectiveness of nisin in gram negative bacteria by growth of coliforms during the storage period of the processed cheese. There were observed the presence of *Salmonella* sp. bacteria and *Listeria monocytogenes*, as envisaged in the legislation. Nisin was efficient in the control of *S. aureus*, keeping them within the limits prescribed by law up to 14 days of production, control of mesophilic aerobic bacteria and lactic acid bacteria. Nisin changed the texture of the curd cheese, observed through sensory testing difference. Sensory analysis also indicated greater acceptability for the curd cheese added nisin. The electrophoretic profile was changed by the addition of nisin, showing proteins with higher molecular weight in the formulation control.

Keywords: Bacteria. Contamination. Conservation. Electrophoresis. Sensorial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de processamento de queijo coalho elaborado com diferentes concentrações de nisina.	31
Figura 2 – Teores médios de umidade (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.	40
Figura 3 – Teores médios de cinzas (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.	41
Figura 4 – Teores médios de gordura e gordura no extrato seco (GES) (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.	42
Figura 5 – Teores médios de proteínas (conteúdo de nitrogênio %) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.	43
Figura 6 - Avaliação do teor de cloretos (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.	44
Figura 7 – Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , em logUFC.g ⁻¹ , das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28dias)...	47
Figura 8 – Crescimento de bactérias aeróbias mesófilas, em logUFC.g ⁻¹ , das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).	49
Figura 9 – Crescimento de bactérias lácticas, em logUFC.g ⁻¹ , das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias)..	50
Figura 10 – Porcentagem de provadores das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina em relação ao sexo.....	52
Figura 11 – Porcentagem de provadores das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina em relação à faixa etária.	53
Figura 12 – Comparação eletroforética das proteínas das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina, em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) corado com nitrato de prata.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes empregados para a elaboração de queijo coalho adicionado de nisina e suas respectivas quantidades (%).	30
Tabela 2 - Componentes do gel de separação a 15% de poliacrilamida.....	36
Tabela 3 - Componentes do gel de concentração/empilhamento a 5% de poliacrilamida.	36
Tabela 4 – Potencial hidrogeniônico médio (pH) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).	38
Tabela 5 – Acidez titulável média, expressa em ácido láctico, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).	39
Tabela 6 – Valores médios de cor (L*, a* e b*) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).	45
Tabela 7 – Contagem média de Coliformes Totais em NMP.g ⁻¹ , das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias)..	46
Tabela 8 – Contagem média de <i>Staphylococcus aureus</i> , em UFC.g ⁻¹ , das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).	48
Tabela 9 – Contagem média de bactérias aeróbias mesófilas em logUFC.g ⁻¹ , das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4° C/ 28 dias).	49
Tabela 10 – Contagem média de bactérias lácticas, em logUFC.g ⁻¹ , das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias)..	51
Tabela 11 – Somatório dos julgamentos obtidos no teste de ordenação das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.....	52
Tabela 12 – Médias dos valores de aceitação para os atributos avaliados pelos provadores das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.	53
Tabela 13 – Índice de aceitabilidade das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	16
	2.1 Objetivo geral	16
	2.2 Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
	3.1 Queijo coalho	17
	3.1.1 Características do queijo coalho.....	18
	3.1.2 Segurança do queijo coalho.....	19
	3.2 Bioconservação	19
	3.3 Bactérias lácticas.....	20
	3.4 Bacteriocinas.....	21
	3.4.1 Classes de bacteriocinas	22
	3.4.2 Espectro de inibição	23
	3.4.3 Fatores interferentes na produção e eficácia das bacteriocinas.....	24
	3.4.4 Aplicações de bacteriocinas em alimentos.....	25
	3.4.5 Aplicação de bacteriocinas em produtos lácteos.....	26
	3.5 Nisina	26
	3.5.1 Aplicações da nisina.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
	4.1 Matéria-prima	30
	4.2 Elaboração do queijo coalho adicionado de nisina.....	30
	4.3 Análises físico-químicas	32
	4.3.1 pH.....	32
	4.3.2 Acidez titulável	32
	4.3.3 Umidade	32
	4.3.4 Gordura.....	33
	4.3.5 Cinzas	33
	4.3.6 Proteínas	33
	4.3.7 Cor.....	33
	4.4 Análises microbiológicas	33
	4.5 Análise sensorial	34
	4.6 Eletroforese	35

4.6.1	Preparo das amostras	35
4.6.2	Análise eletroforética	35
4.6.3	Método SDS-PAGE	35
4.6.5	Preparação dos géis	36
4.6.6	Corrida eletroforética	37
4.6.7	Fixação das proteínas	37
4.7	Análise estatística	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Características físico-químicas	38
5.2	Características microbiológicas	45
5.3	Análise sensorial	51
5.3.1	Teste de diferença.....	51
5.3.2	Teste de aceitação.....	52
5.3.3	Índice de aceitabilidade	54
5.4	Eletroforese (SDS-PAGE)	54
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ANEXO A – Ficha do teste de diferença por ordenação	66
	ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido	67
	ANEXO C – Ficha do teste de aceitação e intenção de compra	70

1 INTRODUÇÃO

O queijo coalho é um produto lácteo tradicional, amplamente produzido e comercializado no Nordeste brasileiro (LIMA, 2010). Seu processo de fabricação é simples e seu rendimento é elevado, tornando-o atrativo principalmente para os pequenos e médios produtores. A falta de padronização no processamento do queijo coalho e de condições higiênico-sanitárias adequadas tem resultado em uma série de produtos que avaliados apresentam-se impróprios para o consumo humano.

A sobrevivência de patógenos presentes no leite é dependente da tecnologia utilizada no processamento do queijo. A acidez e a combinação de tempo e temperatura do processo, assim como a umidade e teor de sal dos queijos constituem os principais fatores que afetam a sobrevivência e a multiplicação de patógenos (BACHMANN et al., 2011). A presença de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos e suas enterotoxinas têm sido constatadas com frequência em leite cru e queijo (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; ROSEC; GUIRAUD, 2002; SENA, 2000; LAMAITA et al., 2005).

As bactérias lácticas desempenham importante papel na fabricação da maioria dos queijos devido à produção de ácido láctico. Essas bactérias apresentam a capacidade de inibir ou reduzir a multiplicação de bactérias gram-positivas, como importantes patógenos de veiculação alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *S. aureus*. Essa inibição se deve a produção de compostos antagônicos, formados em pequenas quantidades pelo catabolismo microbiano, dentre eles estão as bacteriocinas (LEROY; VUYST, 2010; MELLO et. al., 2010).

As bacteriocinas são proteínas, complexos protéicos ou peptídeos biologicamente ativos sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular (CLEVELAND et al, 2001; NASCIMENTO; MORENO; KUYAE, 2008). Essas substâncias podem ser empregadas na indústria de alimentos desde que a linhagem produtora seja *Generally Recognized as Safe* (GRAS). Além de apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser específica sobre algum deles, ser termoestável e não apresentar riscos ao consumidor são as principais características destas bacteriocinas. Além disso, o aumento da segurança do alimento com o uso de bacteriocinas deve ser alcançado sem afetar a qualidade nutricional e sensorial do mesmo (NASCIMENTO; MORENO; KUYAE, 2008).

A utilização de tecnologias que prolonguem a vida útil e a qualidade microbiológica do queijo, considerado um produto de vida de prateleira reduzida e facilmente perecível, é de extrema importância. Entre os métodos de conservação destaca-se a

bioconservação, método que utiliza componentes naturais que são adicionados aos alimentos para garantir sua segurança. Neste trabalho, a adição de diferentes concentrações de nisina foi utilizada como ferramenta para retardar ou impedir o crescimento de alguns micro-organismos e verificar se estas concentrações teriam influência nas características físico-químicas e sensoriais dos queijos produzidos. Estudos sobre a aplicação de nisina em queijos artesanais ainda são limitados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da nisina na contagem microbiana, nas características físico-químicas, sensoriais e no padrão protéico do queijo coalho.

2.2 Objetivos específicos

- Fabricar o queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.
- Avaliar parâmetros físico-químicos como pH, acidez, umidade, gordura, gordura no extrato seco, proteínas, cinzas, cloretos e cor nas formulações de queijo coalho elaboradas;
- Realizar análises microbiológicas para coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, bactérias lácticas, aeróbias mesófilas, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* no produto elaborado;
- Verificar o efeito da nisina na contagem de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, bactérias lácticas e aeróbias mesófilas em diferentes tempos de armazenamento refrigerado (0; 7; 14; 21 e 28 dias) após a fabricação;
- Avaliar a diferença e aceitação das formulações de queijo coalho adicionado de nisina;
- Identificar as alterações proteolíticas no queijo coalho produzido com nisina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Queijo coalho

O queijo coalho é um dos mais tradicionais queijos produzidos no Nordeste brasileiro. É um importante derivado lácteo, consumido tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor que atende aos mais exigentes paladares (RIBEIRO DE SÁ et al., 2003). Este queijo é muito apreciado no Brasil, principalmente na região Nordeste. A maioria desses queijos são fabricados artesanalmente, sendo a produção caseira e ou em propriedades rurais de pequeno porte, tornando difícil quantificar estatisticamente e, portanto, o controle pelos órgãos de inspeção (SANTOS, 2006; DURR, 2007). Segundo Nassu et al. (2006) a produção rural representa uma importante atividade econômica e social, com números significativos na formação de renda dos produtores de leite da zona rural.

O queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar, principalmente os queijos frescos artesanais por serem muitas vezes elaborados a partir do leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA et al., 2003).

Isso torna necessária a investigação do perfil microbiológico do queijo coalho comercializado, abordando a pesquisa de micro-organismos indicadores higiênico-sanitários, que propicia a identificação das condições de produção e comercialização (DANTAS, 2012). Diante disso, o Ministério da Agricultura fixou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, anexado a Portaria nº 146/96 BRASIL, 1996, padronizando os métodos de elaboração de queijos no Brasil. Segundo a legislação brasileira o leite utilizado na fabricação de queijos, com maturação inferior a 60 dias como o queijo coalho, deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). Porém, o leite usado na elaboração deste queijo na maioria das vezes não é pasteurizado (NASSU et al., 2001), tornando-se um risco em potencial para o consumidor, devido à possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos, dentre estes *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e coliformes (DUARTE, 2005). O processo de pasteurização elimina a maioria dos micro-organismos presentes na matéria-prima, processo que, em condições artesanais, pode não ser efetiva (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

3.1.1 Características do queijo coalho

Segundo o Regulamento Técnico de identidade e qualidade do queijo coalho (BRASIL, 2001), as características distintivas do processo de elaboração são: a coagulação em torno de 40 minutos, o corte e mexedura da massa, a remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45 °C) ou cozida, (45 e 55 °C), adição de sal (cloreto de sódio) à massa, prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10 a 12 °C e comercializado normalmente com até 10 dias de fabricação.

As características sensoriais do queijo, como a consistência, o sabor e o odor, são, de forma geral, influenciados pelo fermento láctico adicionado após a pasteurização do leite e pelos micro-organismos que existem normalmente no leite. Segundo a portaria 146/96 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o queijo coalho, por sua umidade relativamente alta e período curto de maturação, deve ser elaborado com leite pasteurizado (BRASIL, 1996). Tal regulamentação, muitas vezes, não é seguida em algumas queijarias artesanais do Nordeste, promovendo diferenças acentuadas no sabor e nas características microbiológicas dos queijos (QUEIROGA et al., 2009).

O queijo coalho deve apresentar consistência elástica, textura compacta ou aberta com olhaduras mecânicas, cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido e salgado, odor ligeiramente ácido de coalhada fresca, casca fina e não muito bem definida, formato e peso variáveis (BRASIL, 2001).

É considerado um queijo de média a alta umidade, de massa semicozida ou cozida e apresentando um teor de gordura no extrato seco variável entre 35,0% e 60,0%. Pode ser adicionado de condimento, devendo este ser citado na denominação do produto. Quando houver a adição de mais de um condimento, pode ser utilizada apenas a denominação “condimentado” após a denominação de “queijo coalho” (BRASIL, 2001).

Dentre as características desejáveis pelos consumidores do queijo coalho estão o sabor, a textura firme, a aparência, o aroma e a capacidade de derretimento. Assim, no caso dos queijos adicionados de condimentos ou outras substâncias espera-se que o produto mantenha esses atributos desejáveis, de modo que não venha a ser rejeitado pelos consumidores (FOGAÇA et al., 2012). Nesse sentido as características de textura ganham notabilidade, principalmente por se tratarem de algo que o consumidor normalmente avalia a primeira vista juntamente com a cor e o aroma, antes das demais características (SANTOS JÚNIOR et al., 2012).

3.1.2 Segurança do queijo coalho

A qualidade do queijo coalho está diretamente relacionada a qualidade de sua matéria-prima. O Ministério da Saúde, através do Regulamento da Diretoria Colegiada (RDC 12 de 02/01/2001) da ANVISA, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos. A ANVISA considera para o queijo coalho uma tolerância de 5×10^2 NMP/g para Coliformes a 45 °C e 5×10^2 UFC/g *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* sp. e de *Listeria monocytogenes*. Em função da ausência de BPF (Boas Práticas de Fabricação) nas queijarias, destaca-se a presença de coliformes totais e termotolerantes, *E. coli*, *Salmonella* sp. e *S. aureus* na maioria dos queijos (SANTANA et al., 2008). Vários estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo coalho relataram a ocorrência de micro-organismos patogênicos e contagens de micro-organismos deteriorantes em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação (FEITOSA et al., 2003; NASSU et al., 2006).

3.2 Bioconservação

Em busca de uma maior qualidade de vida, atualmente, os consumidores estão constantemente preocupados com possíveis efeitos adversos à saúde ocasionados pelo consumo de aditivos químicos em alimentos. Com isso, são atraídos por alimentos seguros, compostos por produtos de alta qualidade nutricional e sensorial e que não tenham sido submetidos a processamentos intensos (CASTRO et al., 2011). Como consequência, a regulamentação em vários países, sobre a legislação de alimentos, tem restringido o uso, bem como os níveis permitidos de alguns dos agentes preservativos aprovados mais utilizados em diferentes alimentos (NASCIMENTO, 2007).

Isso, juntamente com a crescente demanda por alimentos seguros e minimamente processados, com vida de prateleira longa e de fácil preparo, tem estimulado o interesse da indústria de alimentos na busca de novos produtos que atendam a esses requisitos. Essa tendência implica importantes questões microbiológicas, pois a maioria das alterações realizadas comprometem as condições de preservação dos produtos, acarretando diminuição da vida útil satisfatória e de alimentos seguros. É importante que a preservação e segurança desses alimentos seja de alguma maneira restabelecida, mostrando a importância dos agentes antimicrobianos naturais (NASCIMENTO, 2007).

A utilização de bioconservantes, representada pelo emprego de uma microbiota natural ou controlada e seus metabólitos, tais como ácidos orgânicos, enzimas e bacteriocinas, na inibição ou destruição de micro-organismos indesejáveis em alimentos, torna-se uma alternativa tecnológica para a produção de alimentos seguros. Essa técnica consiste em utilizar a capacidade dos micro-organismos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir micro-organismos indesejáveis, sejam deteriorantes ou patogênicos (MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Como exemplo, tem-se a fermentação láctica, que mesmo antiga, é até hoje amplamente empregada na indústria de alimentos. Os produtos finais do metabolismo dessas bactérias, como ácido láctico e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e bacteriocinas, podem atuar como bioconservadores, alterando as propriedades intrínsecas de alimentos e inibindo micro-organismos deteriorantes e patogênicos (DEEGAN et al., 2006).

3.3 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas desempenham importante papel na fabricação da maioria dos queijos devido à produção de ácido láctico que auxilia na sinérese do gel e na desmineralização da coalhada. Elas possuem a capacidade de inibir ou reduzir a multiplicação de bactérias Gram-positivas, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *S. aureus*, por meio da produção de compostos antagônicos, as bacteriocinas (MELLO et al., 2010).

Essas bactérias constituem um grupo diverso e são incluídas nesse grupo bactérias gram-positivas com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. O metabolismo de carboidratos realizado pelas bactérias lácticas pode ser homofermentativo ou heterofermentativo, resultando apenas em ácido láctico ou em ácido láctico e outros produtos como etanol, acetato, dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio, respectivamente. Podem ser divididas em mesofílicas e em termofílicas, de acordo com a temperatura ótima de crescimento (FOX et al., 2000; SILVA JUNIOR, 2002).

Estas bactérias estão amplamente distribuídas em diferentes ambientes, e são comumente encontrados em alimentos (produtos lácteos, carnes e vegetais), sendo presentes também no solo, na boca, trato gastrointestinal e urogenital de humanos e animais (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000; SAVADOGO et al., 2006).

Este grupo de bactérias desempenha um papel importante na maturação, processamento e conservação dos alimentos, devido à sua capacidade de produzir mudanças desejáveis no sabor, aroma e textura, bem como inibir micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Além de estarem presentes em um grande número de alimentos fermentados espontaneamente, possuem grande importância industrial. Industrialmente, essas bactérias também são utilizadas na produção de ácido láctico, de dextrana, na produção e na retenção do ácido láctico no sistema fermentativo de produção de silagem, na atividade de proteases, na produção de compostos aromáticos, nos mecanismos de defesa contra bacteriófagos e na produção de bacteriocinas. Também são utilizadas como probióticos (NASCIMENTO, 2007).

Para que sejam aplicadas industrialmente, as culturas lácticas devem resistir a condições adversas, tais como liofilização, baixas e altas temperaturas, baixos pH e *stress* osmótico (VAN DE GUCHTE et al., 2002). As bactérias lácticas são predominantes em vários alimentos fermentados e devido à maioria dos representantes deste grupo não apresentarem qualquer risco para a saúde humana, são consideradas GRAS (*Generally Recognized As Safe* - usualmente reconhecido como seguro). São consideradas como organismos com "grau alimentício", possuindo potencial utilização na preservação biológica de alimentos. A redução de pH, devido à produção de ácidos e a utilização de carboidratos fermentáveis constituem o principal mecanismo de antagonismo microbiano (DABES; SANTOS; PEREIRA, 2001).

Devido à ação antagonista das bactérias lácticas frente a outros micro-organismos de origem alimentar, como *L. monocytogenes* ou *S. aureus*, através da produção de substâncias inibidoras, incluindo a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, existe um grande interesse em sua utilização para a preservação biológica de alimentos (ORTOLANI, 2009). A produção de bacteriocinas é realizada por todos os gêneros de bactérias lácticas (DE VUYST, 1994).

3.4 Bacteriocinas

Dentre as substâncias com potencial antagonista produzido por bactérias lácticas, as bacteriocinas possuem grande interesse pela indústria de alimentos por não provocarem alterações sensoriais e possuírem atividade específica contra determinados patógenos (HAJIKHANI; BEYATLI; ASLIM, 2007). As bacteriocinas podem ser definidas como pequenos peptídeos ou proteínas, termoestáveis, sintetizadas no ribossomo e biologicamente ativas, com ação inibitória contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora

possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER; HILL; ROSS, 2005; NASCIMENTO; MORENO; KUYAE, 2008).

As bacteriocinas variam em relação ao espectro de atividade, modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (GÁLVEZ et al., 2007). Um grande número de bacteriocinas já foram isoladas e caracterizadas a partir de bactérias lácticas, sendo que algumas são consideradas potenciais agentes antimicrobianos devido à sua ação como conservante de alimentos e pelo seu efeito antagonista contra patógenos importantes. A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem estudada e aplicada como aditivo em alimentos (IVANOVA et al., 2000).

3.4.1 Classes de bacteriocinas

Baseadas na sua estrutura primária, peso molecular, estabilidade ao calor e organização molecular, as bacteriocinas de bactérias lácticas podem ser subdivididas em quatro classes (DEEGAN et al., 2006). A classe I é composta por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (inferior a 5 kDa), os lantibióticos. São caracterizados pela presença dos aminoácidos com ligação tioéter lantionina e β -metil lantionina e outros aminoácidos modificados (PINTO, 1996). A nisina, principal representante deste grupo, é produzida por algumas linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e o crescimento de esporos de *Clostridium* e *Bacillus*. No entanto, não é eficaz contra bactérias gram-negativas, bolores e leveduras (JEEVARATNAM; JAMUNA; BAWA, 2005). Esta classe é subdividida em Ia e Ib.

A subclasse Ia, que inclui a nisina, é composta por peptídeos catiônicos e hidrofóbicos que tem como mecanismo de ação a formação de poros na membrana e tem sua estrutura mais flexível quando comparada com a dos peptídeos da subclasse Ib. A subclasse Ib é composta por peptídeos globulares com carga neutra ou negativa (ALTENA et al., 2000).

A classe II apresenta peptídeos de pouca estabilidade térmica (inferior a 10 kDa), nenhuma modificação nos aminoácidos e também é subdividida em IIa e IIb. A subclasse IIa apresenta bacteriocinas ativas contra *Listeria*, como pediocina e enterocina (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). As pediocinas são produzidas por *Pediococcus* spp., não sendo muito eficazes contra esporos, mas inibe *L. monocytogenes* efetivamente quando comparado com a nisina (GREEN et al., 1997). A subclasse IIb contém bacteriocinas compostas por dois peptídeos diferentes, que agem sinergicamente. São exemplos desse grupo a lactococcina G e M e a lactacina F (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A classe III é constituída por grandes peptídeos termolábeis de peso molecular superior a 30 kDa, também denominadas bacteriolisinas. Contêm em sua estrutura molecular regiões específicas com diferentes funções para translocação, receptores de ligação e atividade letal. São exemplos as lactacinas A e B e helveticina J (JEEVARATNAM; JAMUNA; BAWA, 2005).

Na quarta classe (IV) são incluídas bacteriocinas que formam grandes complexos peptídicos contendo carboidratos ou lipídios em suas estruturas. Cleveland et al. (2001) afirmam que estes complexos são formados devido processos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas. A maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias associadas com alimentos pertencem às classes I e II (MELO, 2003).

3.4.2 Espectro de inibição

A utilização de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, como agentes conservadores de alimentos, aumenta a garantia da segurança microbiológica dos mesmos. As linhagens produtoras têm sido consumidas nos alimentos fermentados há milhares de anos sem serem causadoras de efeitos nocivos à saúde. Estudos realizados com nisina e pediocina mostraram que essas substâncias não são tóxicas a animais de laboratório e a culturas de células (RAY, 1993).

As bacteriocinas apresentam características inerentes a sua ação antimicrobiana. Estes compostos possuem estreita faixa de ação contra seus alvos, limitada apenas a bactérias Gram-positivas. Observou-se que mesmo as bacteriocinas que apresentavam uma faixa de ação maior, não são eficazes contra todas as linhagens de bactérias Gram-positivas patogênicas e deteriorantes, pois uma linhagem pode apresentar células resistentes em sua população, podendo se multiplicar na presença de bacteriocinas (CINTAS et al., 2001).

O espectro antibacteriano inclui micro-organismos deteriorantes e patogênicos de origem alimentar, como a *L. monocytogenes* e *S. aureus* (NASCIMENTO, 2007). A nisina apresenta eficiente atividade antimicrobiana em diversos sistemas alimentares, inibindo o desenvolvimento de uma ampla variedade de bactérias Gram positivas, como *L. monocytogenes*, *Bacillus* sp. e esporos de *Clostridium* sp. (DEEGAN et al., 2006), porém, sua utilização pode ser limitada devido à interação com fosfolipídeos, baixa solubilidade, distribuição desuniforme, baixa estabilidade, inativação por enzimas endógenas de alguns alimentos, inibição de culturas iniciadoras, ou ainda, pelo surgimento de micro-organismos resistentes (ALVES et al., 2006; BROMBERG et al., 2006).

Apesar de algumas limitações, a nisina é eficaz contra bactérias Gram-negativas quando utilizada com agentes quelantes (STEVENS, 1992). Outras bacteriocinas, tais como pediocina PA-1 e PAC 1,0, produzidas por espécies de *Pediococcus*, possuem atividade antilisteria em carne bovina fresca (NIELSEN; DICKSON; CROUSE, 1990) e em salsichas fermentadas (FOEGEDING et al., 1992), respectivamente.

3.4.3 Fatores interferentes na produção e eficácia das bacteriocinas

A utilização de culturas bacteriocinogênicas na bioconservação de alimentos deve ser avaliada detalhadamente para cada sistema alimentar e seu espectro de ação, visando uma aplicação adequada dessas culturas no controle de patógenos ou micro-organismos deteriorantes sensíveis (ALVES et al., 2006). Alguns fatores podem comprometer a eficácia na produção e atividade de bacteriocinas em alimentos, como o antagonismo por outros micro-organismos presentes, o surgimento de micro-organismos resistentes, a perda espontânea ou a redução na capacidade de produção de bacteriocinas, a presença de enzimas proteolíticas não específicas, a oxidação, a presença de metais pesados, a agitação excessiva, o congelamento-descongelamento, a ligação com componentes do alimento, a interação com componentes apolares e polares, o efeito do pH na produção de bacteriocinas e na solubilidade e ambientes desfavoráveis para multiplicação bacteriana (pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes) e consequentemente, para a produção de bacteriocinas (HOOVER; STEENSON, 1993).

A concentração das bacteriocinas nos alimentos também é um fator que influencia a atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2006). Devem também ser considerados a presença de bactérias patogênicas e formadoras de esporos que sejam resistentes à bacteriocina, condições de desestabilização da atividade biológica de proteínas, tais como proteases e processos oxidativos, ligação aos componentes do alimento, tais como partículas lipídicas e proteínas, inativação pela presença de aditivos, baixa solubilidade e distribuição irregular no alimento, ação do pH na estabilidade e atividade da bacteriocina. Apesar de inúmeros trabalhos envolvendo a produção de bacteriocinas (LEROY; VUYST, 2010; MOTTA; BRANDELLI, 2003; NEL et al., 2001; TODOROV; DICKS, 2007), devido à complexidade da matriz dos alimentos, ainda são necessários um melhor conhecimento das interações desses fatores com a produção de bacteriocinas (DELGADO et al., 2007).

3.4.4 Aplicações de bacteriocinas em alimentos

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas *starters*; pela adição destas culturas em conjunto com culturas *starters*; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (NASCIMENTO, 2007).

Para que uma bacteriocina possa ser utilizada na indústria de alimentos deve atender alguns critérios, como: apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles; deve ser termoestável; não pode apresentar risco à saúde do consumidor; ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial (HOLZAPFEL; GEISEN; CHILLINGER, 1995). O'Sullivan (2007) relata que, para a adição em alimentos, a linhagem produtora de bacteriocina deve ser GRAS, como é o caso da maioria das bactérias lácticas. Caso seja empregada a forma purificada da bacteriocina também deve ser GRAS, sendo que somente a nisina é reconhecida e utilizada comercialmente em indústrias de alimentos (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

As bacteriocinas têm aplicação em diversos alimentos e a sua capacidade em inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos de origem alimentar varia de acordo com a linhagem, a bacteriocina produzida e o tipo de alimento (McMULLEN; STILES, 1996). Já foram descritas diferentes formas de utilização de bacteriocinas em leite e seus derivados, vegetais e frutas enlatadas, carne, pescado e bebidas alcoólicas (ECKNER, 1992).

As bacteriocinas podem ser produzidas por bactérias constituintes da cultura *starter* durante a fermentação. Contudo, fatores intrínsecos do alimento, como pH, podem impossibilitar a produção ótima das bacteriocinas por estas culturas (YEZZI; AJAO; ZOTOLLA, 1993). Além disso, linhagens diferentes de micro-organismos de uma mesma espécie podem produzir quantidades diferentes da mesma bacteriocina (DE VUYST, 1994).

Degnan; Buyong; Luchansky (1993) constataram que até 90% da atividade da pediocina aplicada a uma emulsão alimentar pode ser protegida por meio de processo de encapsulação lipossomal. As condições de processamento do alimento também podem influir na ação das bacteriocinas. O pH pode influenciar na solubilidade da nisina, contribuindo para sua maior ou menor eficiência (LIU; HANSEN, 1990).

A bacteriocina mais conhecida e estudada é a nisina, produzida por inúmeras linhagens de *Lc. lactis*. Sua DL50 é similar a do cloreto de sódio, 3.330.000UI/Kg (FRAZER; SHARRATT; HICMAN, 1962). Tem sido empregada, em larga escala na indústria de alimentos de vários países, como conservante natural de produtos lácteos. Também tem sido verificado que outras bacteriocinas, como pediocinas e enterocinas, apresentam potencial de aplicação no controle de micro-organismos indesejáveis, principalmente *Listeria* spp. (NASCIMENTO, 2007).

3.4.5 Aplicação de bacteriocinas em produtos lácteos

As bacteriocinas são comumente empregadas como agentes de biocontrole para a inibição de micro-organismos patogênicos em queijo, devido aos inúmeros casos de surtos de origem alimentar associados ao consumo desse tipo de alimento. De acordo com Muriana (1996), a pediocina e a nisina podem inibir ou reduzir as contagens de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, principalmente em queijos pasteurizados. Além disso, a nisina é bastante eficiente contra o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, assim como o desenvolvimento de *Clostridium tyrobutyricum* em queijos semiduros (RODRIGUEZ et al., 2001).

Segundo O'Sullivan et al. (2007), uma vantagem da aplicação de culturas bacteriocinogênicas e suas bacteriocinas é a redução do período de maturação de queijos. Esse menor período de maturação ocorre devido a liberação de aminopeptidases intracelulares na matriz do queijo, ocasionada pela lise celular do fermento láctico, provocado pelas culturas bacteriocinogênicas, que contribuem com a proteólise e formação de *flavour* desejáveis.

3.5 Nisina

A nisina é uma bacteriocina produzida por linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, naturalmente produzida em produtos fermentados. Foi descoberta em 1928 e vem sendo consumida há séculos através dos produtos lácteos em que estavam presentes (MELO; SOARES; GONÇALVES, et al., 2005). A introdução da nisina para uso comercial ocorreu na Inglaterra em 1953, sendo aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para o uso como conservante em alimentos e reconhecida como GRAS (Generally Regarded as Safe) em 1988. Tornou-se então a primeira bacteriocina aprovada para uso comercial em aplicações alimentares no processamento de leite e derivados e atualmente tem seu uso aprovado em mais de 50 países (COTTER; HILL; ROSS, 2005; DEEGAN, et al. 2006).

É utilizada em uma infinidade de produtos como queijos, inclusive queijos processados, vegetais, frutas enlatadas, produtos de padaria, cremes de confeitaria, leite, produtos lácteos, pudins, carne processada, embutidos (MORAES, 2002), ovo líquido, molhos, sopas, conservas, cervejas, sobremesas, pescados, maionese e alimentos infantis (BENKERROUM et al., 2002). No Brasil, seu uso é permitido, com limite de $12,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de produto final para todos os tipos de queijos (BRASIL, 1996).

A molécula da nisina consiste em um pequeno polipeptídeo de peso molecular de 3,5 kDa, de característica anfifílica, formado por 34 aminoácidos com grupos terminais amina e carboxila e cinco anéis internos envolvendo pontes dissulfeto. Possui os resíduos atípicos de dehidroalanina e dehidrobutirina, além dos anéis de lantionina e β -metil-lantionina já característicos dos lantibióticos (PAPAGIANNI, 2003). Existem dois tipos naturais de nisina: a nisina A e a nisina Z, as quais diferem apenas no aminoácido que está presente na posição 27; a histidina na nisina A e a asparagina na nisina Z. Ambos tipos de nisina apresentam uma atividade antimicrobiana equivalente, no entanto a nisina Z apresenta maior solubilidade e características de difusão em relação a nisina A, características relevantes quando se trata da aplicação em alimentos (ARAUZ et al. 2009).

Os lantibióticos como a nisina tem a membrana plasmática como principal sítio de ação nas células Gram-positivas, podendo atuar de duas maneiras: podem se ligar a lipídios, impedindo assim a síntese correta da parede celular, ou utilizar os lipídios como moléculas de ancoragem para iniciar um processo de inserção na membrana e formação de poros, ambos causando a morte celular. Essas interações ocasionam a formação de poros e consequentemente efluxo de constituintes essenciais da célula como aminoácidos, íons de potássio e ATP, o que provoca paralisação de todos os processos metabólicos celulares (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A nisina esta sujeita a sofrer influências quanto a sua atividade em função de fatores tais como pH, temperatura, composição e estrutura do alimento bem como pela microbiota natural do alimento (ZHOU et al., 2013). Estes autores destacam que já foram verificados casos de resistência das bactérias Gram-positivas a esta substância, sendo que os mecanismos de resistências sejam extremamente complexos, variando desde alteração na superfície bacteriana pela alteração na composição de ácidos graxos e fosfolipídios da membrana e da parede até mesmo ação proteolítica de enzimas sobre o peptídeo.

3.5.1 Aplicações da nisina

Os alimentos são esterilizados ou pasteurizados durante seu processamento. Bactérias gram-negativas, bolores e leveduras acabam morrendo durante esses processos, porém a microbiota de bactérias esporuladas gram-positivas muitas vezes sobrevivem a esses processos e podem ser controladas através da utilização da nisina para eliminar ou minimizar a contaminação pós-processamento (SETTANNI; CORSETTI, 2008).

Pinto et al. (2011) verificaram o efeito antimicrobiano da nisina sobre *S. aureus* em queijo Minas artesanal do Serro. Observaram que a nisina foi efetiva na redução da população de *S. aureus* de 1,2 e 2,0 ciclos log na contagem de *S. aureus* a partir do sétimo dia de maturação para os queijos contendo 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ (Unidades internacionais por mililitro) de nisina, respectivamente, em comparação ao queijo controle.

Kykkidou et al. (2007) avaliaram o uso da nisina como um tratamento antimicrobiano, com o objetivo de aumentar a vida-de-prateleira de Queijo Galotyri. Os queijos foram inoculados com 50 UI.g⁻¹ e 150 UI.g⁻¹ de nisina e foram armazenados em condições aeróbias, a 4 °C, por 42 dias. Houve um aumento na vida de prateleira dos queijos de 21 dias no queijo controle, para 35 dias nos queijos adicionados de 50 UI.g⁻¹ de nisina e 42 dias naqueles adicionados de 150 UI.g⁻¹.

Em estudo associando a nisina com outro composto antimicrobiano chamado reuterina, substância reconhecidamente antimicrobiana com amplo espectro de ação sobre bactérias veiculadas por alimentos, realizado por Arqués et al. (2011) utilizando o leite, verificaram que dentre as várias substâncias testadas (nisina, lacticina 481, enterocina I e enterocina AS-48) em associação com a reuterina, a nisina foi a única que aumentou efeito inibidor sobre *S. aureus*, enquanto os demais compostos também apresentaram efeito sobre *Listeria*. Assim, os autores concluíram que a associação da nisina com a reuterina também pode ser uma possibilidade de controle destes patógenos diretamente no leite e mantido a baixas temperaturas.

Em estudo realizado por García et al. (2010) foram testados dois níveis de *S. aureus* no leite pasteurizado (10² UFC. mL⁻¹ e 10⁵ UFC. mL⁻¹). A adição de nisina foi capaz de inibir a multiplicação de *S. aureus* no leite mantendo a mesma contagem inicial ao final de 8 horas de incubação. Esses trabalhos corroboram o uso da nisina como uma alternativa para inibir bactérias Gram-positivas, principalmente em leite e derivados, no entanto, pesquisas devem ser conduzidas em cada tipo de produto, pois a atuação da nisina é influenciada pela matriz dos diferentes alimentos, favorecendo ou inibindo sua capacidade bactericida e

bacteriostática. Estudos sobre aplicação de nisina em queijos artesanais ainda são limitados (SOBRAL, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Os ingredientes utilizados para elaboração dos queijos foram adquiridos no comércio local e encaminhados para a planta de processamento de leite do Instituto Federal do Ceará (IFCE) *Campus* Limoeiro do Norte – CE. A nisina e o fermento foram obtidos em comércio especializado na venda de aditivos alimentares (Grupo Bela Vista Ltda.).

4.2 Elaboração do queijo coalho adicionado de nisina

Para a elaboração do queijo coalho a nisina foi adicionada diretamente ao leite durante o processo de fabricação do queijo. Foram elaboradas quatro formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina correspondendo às quantidades de 0 mg.kg⁻¹ (F0 - controle); 3 mg.kg⁻¹ (F1); 6 mg.kg⁻¹ (F2) e 12,5 mg.kg⁻¹ (F3) (Tabela 1).

Tabela 1 – Ingredientes empregados para a elaboração de queijo coalho adicionado de nisina e suas respectivas quantidades (%).

Ingredientes	Formulações (%)			
	F0	F1	F2	F3
Leite	98,3000	98,2998	98,2996	98,2992
Fermento lácteo	0,7000	0,7000	0,7000	0,7000
Nisina	-	0,0002	0,0004	0,0008
Cloreto de sódio	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Total	100			

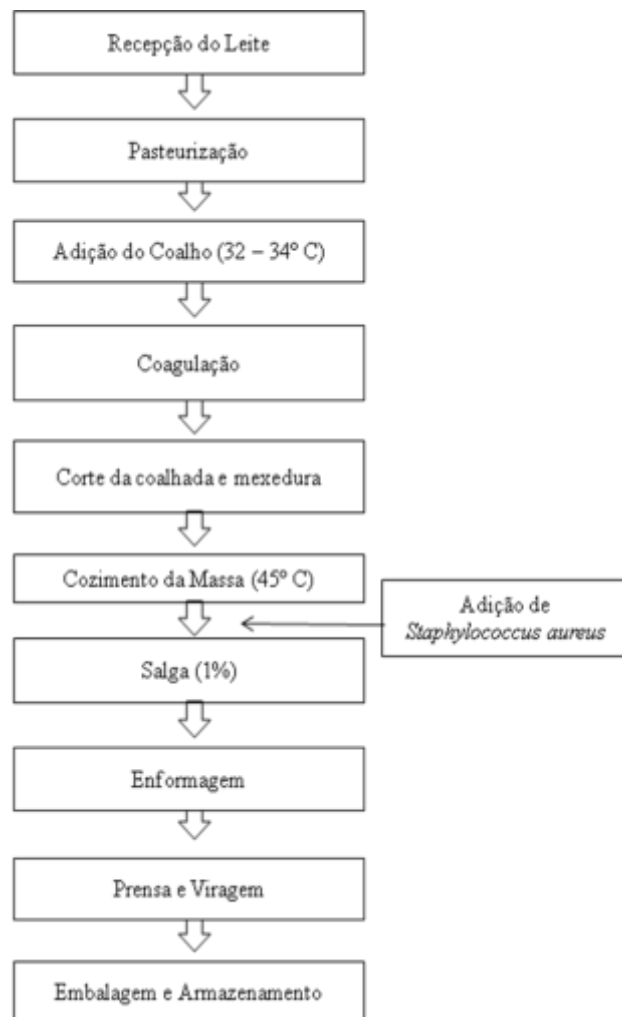
O queijo coalho foi fabricado pelo método tradicional como descrito a seguir: o leite previamente pasteurizado foi aquecido a uma temperatura de 32-34 °C e adicionado a nisina nas concentrações selecionadas, separadamente. A seguir, foi adicionado o coagulante microbiano, de acordo com as instruções do fabricante, e o fermento, na proporção de 1 mL de fermento para 1 L de leite. Em seguida, o leite foi homogeneizado por cerca de dois minutos e deixado em repouso por um período médio de 40 minutos.

Posteriormente, quando a coalhada apresentou-se com aspecto firme e brilhante, foi realizado o corte lentamente. A massa permaneceu em repouso por cerca de cinco minutos. A mexedura foi iniciada com movimentos leves, com auxílio de uma pá de aço inoxidável e sob aquecimento durante 20 minutos até que a temperatura da massa atingisse 45 °C, permanecendo por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a dessoragem, retirando-se

cerca de 90% do soro. Nesta etapa, ocorreu a adição do inóculo microbiano. Foram utilizadas as cepas ATCC 25923 de *S. aureus*, que foram adicionadas à massa de acordo com a metodologia descrita por Chioda et al. (2006).

A massa foi salgada 1% de NaCl e deixada em repouso por 20 minutos. Em seguida, foi realizada a segunda dessoragem a fim de obter-se uma massa firme e compacta. A massa foi colocada em formas plásticas com dessoradores e, logo em seguida, foi submetida à prensagem durante 15 horas, sendo realizada uma viragem após uma hora. Depois de prensados, os queijos coalhos foram embalados em sacos plásticos estéreis e armazenados sob refrigeração (4 ± 1 °C). Também foram fabricados queijos sem a inoculação de *S. aureus*, para utilização na análise sensorial. O fluxograma de processamento de queijo coalho está apresentado conforme a figura 1.

Figura 1 – Fluxograma utilizado para o processamento de queijo coalho elaborado com diferentes concentrações de nisina.



FONTE: Elaborada pela autora.

4.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Química de Alimentos do IFCE *Campus* Limoeiro do Norte. Foram feitas em triplicata e seguiram as recomendações da AOAC (2002).

4.3.1 pH

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizado através de leitura em potenciômetro eletrônico sob agitação calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Foi realizada nos períodos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a fabricação nas formulações do queijo coalho.

4.3.2 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 M. Aproximadamente 5 g de queijo coalho de cada formulação foram diluídos em 50mL de água destilada. Foram utilizadas 3 gotas de fenolftaleína a 1% como indicador. A solução de NaOH 0,1 M foi adicionada lentamente até a mudança de cor para levemente róseo. Os resultados foram expressos em gramas de ácido láctico em 100g de queijo. Foi realizada nos períodos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a fabricação nas formulações do queijo coalho.

4.3.3 Umidade

Foi determinada pelo método gravimétrico. Foram pesados aproximadamente 3 g de queijo coalho de cada formulação e aquecidos à 100 °C. As amostras foram pesadas até peso constante e em seguida o teor de umidade foi calculado, sendo o resultado expresso em porcentagem.

4.3.4 Gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber, conforme metodologia descrita pelo IAL (2005), utilizando butirômetro para análises de queijo. O teor de gordura no extrato seco foi determinado relacionando ao teor de gordura ao extrato seco, sendo o resultado expresso em porcentagem.

4.3.5 Cinzas

Foi determinada pelo método gravimétrico. Foram pesados aproximadamente 3 g de queijo coalho de cada formulação e incinerados à 600 °C. As amostras foram pesadas até peso constante e em seguida o teor de cinzas foi calculado, sendo o resultado expresso em porcentagem.

4.3.6 Proteínas

O teor proteico foi obtido pela determinação do teor de nitrogênio total, por destilação em aparelho micro *Kjeldahl* (Marca marqlabor). A conversão do teor de nitrogênio amoniacal em proteína foi realizada através da multiplicação do valor por 6,25.

4.3.7 Cor

A cor instrumental foi determinada utilizando-se o colorímetro Chroma Meter CR-400/410 de 8 mm de diâmetro e iluminante padrão CIE C, da marca Konica Minolta Sensing (Tokio, Japão), que o utiliza do sistema de coordenadas CIE/LAB (CIE, 1986). O aparelho foi previamente calibrado em superfície branca e negra. O colorímetro forneceu diretamente os parâmetros L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul). Foi realizada nos períodos de 0, 14 e 28 dias após a fabricação nas formulações do queijo coalho.

4.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no dia da fabricação e nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias após a fabricação nas formulações do queijo coalho, seguindo o

Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos (BRASIL, 1996) que estabelece análises de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* para queijos. Também foram realizadas contagens de aeróbios mesófilos e bactérias lácticas. As análises foram realizadas em triplicata e de acordo com a metodologia do *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, da American Public Health Association (APHA, 2001).

4.5 Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada através de testes de diferença (ordenação) e de aceitação (escala hedônica e intenção de compra), sendo as amostras apresentadas no laboratório de Análise Sensorial do Instituto Federal do Ceará, *Campus Limoeiro do Norte*, seguindo a metodologia recomendada por Dutcosky (2013).

As formulações de queijo foram fracionadas em pedaços de 10 gramas, distribuídos em recipientes descartáveis, previamente codificados com números de três dígitos, servidos em cabines individuais, sob o delineamento de blocos completos em relação à ordem de apresentação das amostras.

Primeiramente foi realizado o teste de diferença por ordenação (unilateral) com objetivo de pré-seleção das amostras. O teste foi realizado por provadores treinados que avaliaram as quatro formulações ordenando a formulação de textura mais macia em primeiro lugar e a de textura mais dura por último (Anexo A). A equipe foi composta por 12 julgadores, com 3 replicatas, totalizando 48 respostas. As formulações que apresentarem diferença estatística entre si foram avaliadas através de teste afetivo.

No teste afetivo a equipe de provadores foi constituída por 120 provadores não treinados, de ambos os sexos e diferentes idades. Para cada provador foram fornecidas as formulações de queijo que apresentaram diferenças sensoriais no teste de ordenação. Foi solicitada a avaliação através do teste de escala hedônica estruturada de nove pontos, variando de “desgostei muitíssimo” a “gostei muitíssimo”, e do teste de intenção de compra com escala estruturada de cinco pontos, variando de “certamente não compraria” a “certamente compraria”. Entre a prova de cada amostra foi recomendado aos provadores o consumo de água a temperatura ambiente e biscoito do tipo água e sal, a fim de eliminar sabor residual.

Para a realização dos testes sensoriais os provadores não treinados foram instruídos a ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, concordando em

participar da análise sensorial como voluntário (Anexo B) e a preencherem a ficha do teste de aceitação e intenção de compra (Anexo C).

4.6 Eletroforese

4.6.1 Preparo das amostras

As amostras previamente congeladas foram descongeladas e pesadas 2 mg de cada, que foram então dissolvidas em 800 µL de tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) e 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos e acrescidas de 200 µL de 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Sendo congeladas até o momento da aplicação no gel (EGITO et al., 2006).

4.6.2 Análise eletroforética

A caracterização eletroforética dos queijos foi realizada, em duplicata, segundo metodologia recomendada por Egito et al. (2006), por meio do método de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, ou seja, com adição de SDS (Dodecil sulfato de sódio, detergente aniônico – SDS-PAGE), em aparelho para eletroforese vertical.

4.6.3 Método SDS-PAGE

A técnica de SDS-PAGE foi realizada mediante géis de poliacrilamida com concentração de 5% em 125 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15% de poliacrilamida em 380 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS.

4.6.4 Preparação das placas

Placas de vidro (10 cm x 10 cm) foram lavadas, enxaguadas com água destilada e desengorduradas com álcool a 70%. Em seguida, foram montadas com a ajuda de espaçadores de 1,5 mm de espessura, colocados entre as mesmas. Foi verificado se existia vazamento entre as placas adicionando água destilada, caso não existisse vazamento, a água foi descartada e as placas secas com tiras de papel toalha.

4.6.5 Preparação dos géis

A preparação do gel de separação e do gel de concentração/empilhamento seguiram a metodologia de Egito et al. (2006), conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Componentes do gel de separação a 15% de poliacrilamida.

Reagentes	Molaridade (mol/ L)	Teor (%)	Volume (μL)
Acrilamida	5,16	99,9	4110
Tampão (Tris-HCl)	1,50	99,8	2510
SDS a 10%	0,35	90,0	100
Temed	-	99,0	10
Persulfato de amônio	0,22	98,0	60

Após a preparação da solução de separação, a mesma foi vertida entre as placas de vidro e em seguida acrescentada de água destilada, para ajudar na polimerização. O início do preparo da solução de concentração/empilhamento foi realizado após a polimerização do gel, que ocorreu em aproximadamente 30 minutos. Após a polimerização do gel, o molde foi inclinado para a remoção da água destilada. A solução de concentração/empilhamento a 5% foi preparada conforme descrito na Tabela 3. Em seguida, a solução de concentração foi adicionada lentamente sobre o gel de separação polimerizado. Um molde em forma de pente foi acomodado sobre o gel de concentração, com o objetivo de formar canaletas/poços que permitiram a aplicação das amostras. Para a polimerização do gel, foram aguardados aproximadamente 30 minutos.

Tabela 3 – Componentes do gel de concentração/empilhamento a 5% de poliacrilamida.

Reagentes	Molaridade (mol/ L)	Teor (%)	Volume (μL)
Acrilamida	5,16	99,9	520
Tampão de Concentração	0,50	99,8	1010
SDS a 10%	0,35	90,0	40
Temed	-	99,0	4
Persulfato de amônio	0,22	98,0	80

No momento em que o gel de concentração/empilhamento polimerizava, as amostras foram descongeladas e preparadas, através da homogeneização utilizando-se vórtex por alguns minutos. Após a polimerização do gel de concentração, retirou-se o pente e com a ajuda de uma micropipeta aplicou-se 10 μL das amostras de cada formulação, de modo que a

quantidade de proteína aplicada em cada canaleta/poço fosse de 20 µg. No segundo poço do gel foi depositado o volume de 10 µL do marcador de massa molar SDS-PAGE.

4.6.6 Corrida eletroforética

A migração das proteínas ocorreu por aproximadamente 3 hora e 30 minutos. Foi realizada com uma corrente elétrica constante de 200 V, amperagem de 40 mA.

4.6.7 Fixação das proteínas

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e as proteínas fixadas no gel com 12% de ácido tricloroacético (TCA) durante 30 min. Após a fixação, o gel foi imerso em solução corante com 0,1% de Azul de Coomassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 120 min. A descoloração foi realizada durante uma noite com uma solução a 30% de etanol e 7,5% de ácido acético. As proteínas também foram coradas utilizando nitrato de prata.

4.7 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em esquema fatorial de 4 x 5, onde o primeiro fator corresponde as formulações (F0, F1, F2 e F3) e o segundo fator os tempos de armazenamento (0, 7, 14, 21 e 28 dias), com 3 repetições. Para os testes sensoriais (diferença e aceitação) foi aplicado o delineamento em blocos completos balanceados.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de comparação de médias *Tukey* ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Assistat versão 7.7 beta (SILVA, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características físico-químicas

Durante o período de armazenamento, observou-se um ligeiro decréscimo nos valores de pH dos queijos elaborados (Tabela 4), com diferença significativa entre os tratamentos e o tempo de armazenamento ($p > 0,05$). No início do armazenamento ocorreu maior aumento do pH nas formulações adicionadas de nisina (F1, F2, e F3) em relação à formulação controle (F0). Ao final do armazenamento verificou-se que o queijo da Formulação F0, sem adição de nisina, apresentou valores de pH sem diferença estatística ($p > 0,05$) dos valores das formulações F1 e F2, que continham menores quantidades de nisina.

Tabela 4 – Potencial hidrogeniônico médio (pH) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).

Formulação	Período de Armazenamento (Dias)				
	0	7	14	21	28
F0	6,05 bA	6,14 bA	5,79 bB	6,09 aA	6,04 aA
F1	6,18 bB	6,58 aA	5,95 bC	6,24 aB	6,06 aC
F2	6,53 aB	6,77 aA	6,04 bC	6,14 aC	5,92 aC
F3	6,21 bB	6,70 aA	6,37 aB	6,24 aB	5,62 bC

FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A formulação F0 (Controle) apresentou diferença estatística nos valores de pH apenas com 14 dias de armazenamento, mantendo-se sem diferença nos demais dias. A Formulação F2 apresentou comportamento constante, sem diferença estatística, nos valores de pH a partir dos 14 dias de armazenamento.

As variações de pH em queijos podem ocorrer em função das doses e da atividade do fermento lácteo utilizado no processo de fabricação dos queijos (MACHADO et al., 2004). Neste estudo, as doses de fermento lácteo estavam padronizadas para que interferissem o mínimo possível na variação de acidez dos queijos. Essas variações também podem ser influenciadas pela população de bactérias lácticas, através da produção de ácido láctico. Pinto et al. (2011) também encontraram diferença significativa nos valores de pH em função do tempo (60 dias) de maturação de queijos artesanais do Serro, mas não em função das concentrações de 0, 100 e 500 UI.mL⁻¹ de nisina, diferindo do presente estudo.

Kykkidou et al. (2007), aplicaram nisina em queijo Galotyri, um queijo grego macio, e não encontraram diferenças significativas entre os valores de pH dos queijos fabricados com e sem nisina. No entanto, tratava-se de um queijo fabricado por coagulação ácida e a nisina foi adicionada após o processo de fermentação do queijo, interferindo de forma menos intensa na acidez.

Na Tabela 5 dispõe-se as variações dos valores de acidez titulável, expressa em gramas ácido láctico em 100 g de queijo coalho. No Dia 0, as formulações F0 e F2 apresentaram maiores valores de acidez, porém, esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$) em relação às demais formulações (Tabela 5).

Tabela 5 – Acidez titulável média, expressa em g de ácido láctico/100 g de queijo, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).

Formulação	Período de Armazenamento (Dias)				
	0	7	14	21	28
F0	0,38 aA	0,25 aB	0,20 aB	0,22 aB	0,37 aA
F1	0,15 aBC	0,13 bC	0,20 aB	0,20 aB	0,38 aA
F2	0,55 aA	0,06 cB	0,19 aAB	0,21 aAB	0,41 aAB
F3	0,09 aA	0,07 cA	0,50 aA	0,23 aA	0,36 aA

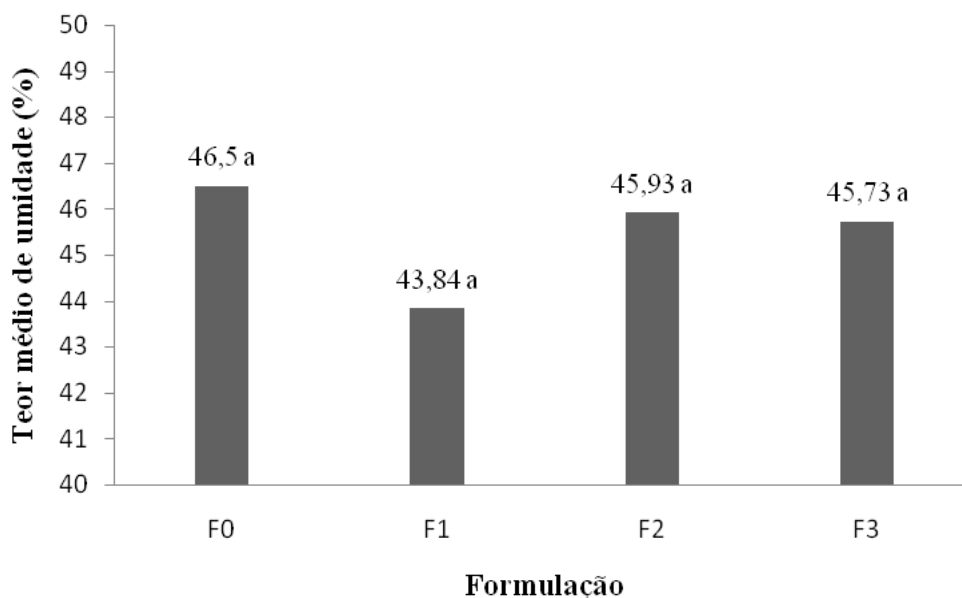
FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Assim como o pH, a acidez titulável está relacionada com a população de bactérias lácticas e sua produção de ácido láctico. Esses dois parâmetros são inversamente proporcionais, portanto, com o aumento da produção de ácido láctico, ocorre diminuição nos valores de pH. A partir dos 21 dias de fabricação os valores de acidez passaram a não apresentar diferença estatística ($p > 0,05$) entre as formulações.

Perez (2005), em estudo com amostras de queijos tipo coalho industrializado, encontrou valores de acidez que variaram de 0,18 a 0,50 g de ácido láctico/100 g de queijo. Oliveira et al. (2010) ao analisarem o queijo tipo coalho produzido no município de Jaguaribe – CE, encontraram um percentual de ácido láctico variando de 0,13 a 0,57%.

Os valores de umidade dos queijos coalho elaborados estão apresentados na Figura 2. Os valores de umidade variaram entre 43,5 a 46,5%, não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) entre as formulações.

Figura 2 – Teores médios de umidade (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.



FONTE: Elaborada pela autora.

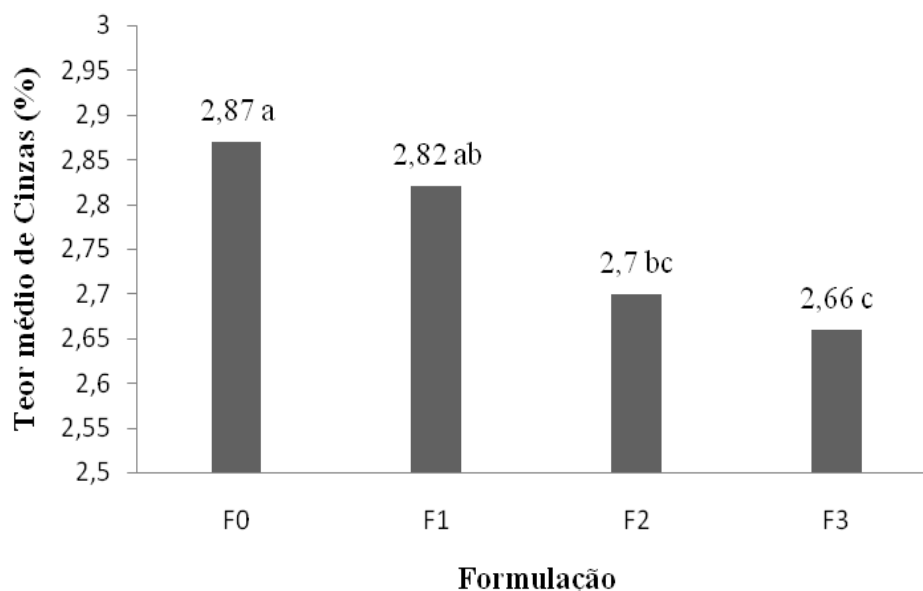
De acordo com Brasil (1996) os queijos fabricados podem ser classificados como queijos de média e alta umidade, sendo que o controle apresentou alta umidade e aqueles adicionados de nisina apresentam média umidade. Oliveira (1986) afirma que o teor de umidade é um dos parâmetros que sofre maior variação nos queijos, sendo este correlacionado com o tempo de conservação do produto, pois os queijos mais desidratados, apresentarem maior dureza e conservação, mesmo em condições adversas. Quanto maior o teor de umidade de um queijo, mais rápido ocorrerá à proteólise, tendo como consequência a modificação da consistência e do sabor do queijo. O teor de umidade interfere diretamente nas ações metabólicas de micro-organismos ao longo do armazenamento do queijo, com suas possíveis variações nos parâmetros de pH, textura, sabor e aroma.

Semelhante a este trabalho, Teodoro (2012) observou que os teores de umidade dos queijos Minas artesanal da Serra da Canastra não foram influenciados pelos tratamentos com nisina (0, 100 e 500 UI.mL⁻¹). No entanto, Sobral (2012) analisando queijo Minas artesanal da região do Araxá adicionado de nisina (0, 100 e 400 UI.mL⁻¹) verificou diferenças significativa ($p > 0,05$) no teor de umidade dos queijos com diferentes concentrações de nisina, durante o tempo de maturação e na interação entre estes dois fatores.

Na Figura 3 estão os valores do teor de cinzas dos queijos coalho elaborados com nisina. Foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as formulações, sendo que

a formulação F0, sem adição de nisina, apresentou o maior valor de cinzas em relação às demais formulações.

Figura 3 – Teores médios de cinzas (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.



FONTE: Elaborada pela autora.

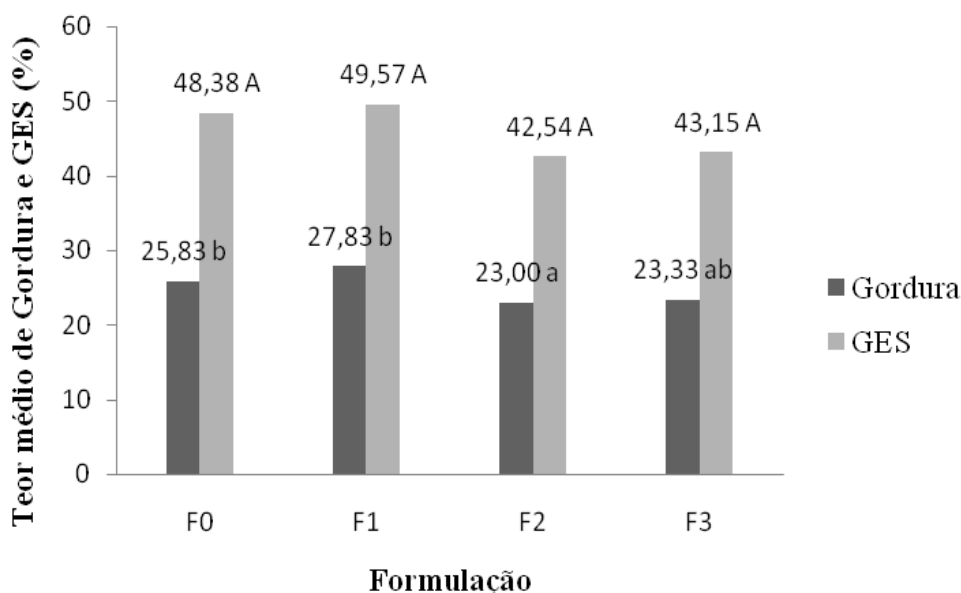
Sobral (2012), diferentemente deste trabalho, verificou que diferentes concentrações de nisina (0, 100 e 400 UI.mL⁻¹) não influenciaram significativamente o teor de cinzas dos queijos minas da região do Araxá. A porcentagem de sais e cinzas no leite podem ser modificados por diferentes fatores, como alimentação animal, estações do ano, estágios de lactação e doenças como a mastite. O conteúdo de sais é maior no início da lactação, em seguida diminui e depois volta a aumentar no final da lactação (SILVA, 2004), portanto, o conteúdo de cinzas apresentado por esses queijos pode ser influenciado também pelo tipo de leite utilizado.

Os valores de gordura dos queijos coalho elaborados apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre as formulações, variando entre 23 e 27,8%, entretanto, a diferença não foi significativa nos valores de gordura no extrato seco (GES) (Figura 4).

Cavalcante et al. (2007), avaliando queijo tipo coalho elaborado com cultura lácticas endógenas após dez dias encontraram valores médios de gordura de 28%. Teodoro (2012) não verificou diferença entre os tratamentos (0, 100 e 500 UI.mL⁻¹), indicando que a nisina não interferiu no teor de gordura dos queijos Minas artesanais Canastra. Pinto et al.

(2011) também não verificaram influência da adição de nisina (100 UI.mL^{-1} e 500 UI.mL^{-1}) sobre o teor de gordura em queijos Minas artesanais do Serro.

Figura 4 – Teores médios de gordura e gordura no extrato seco (GES) (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.



FONTE: Elaborada pela autora.

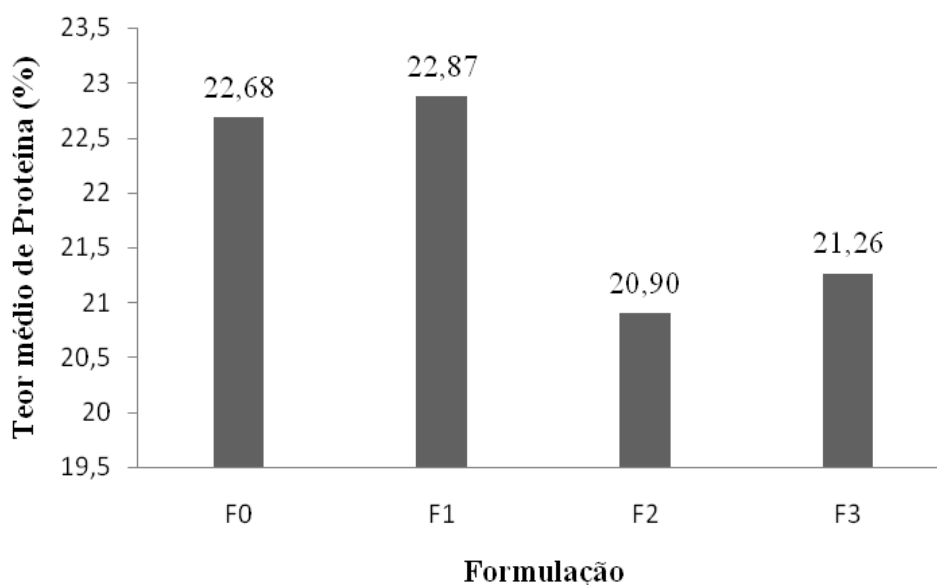
De acordo com a IN nº 30 de 2001, sobre a qualidade de queijo coalho, o queijo de massa semicozida ou cozida, classificado como de média a alta umidade, pode apresentar o teor de gordura nos sólidos totais entre 35 a 60% (BRASIL, 2001). Baseado neste regulamento observa-se que os queijos desenvolvidos nesta pesquisa apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos, com valores de teor de gordura no extrato seco entre 42,54 e 49,57%, sendo classificados como queijos gordos. Teodoro (2012) teve seu queijo classificado quanto ao teor de gordura, conforme Brasil (1996), como gordo (GES entre 45 e 59,9 % m/m) para todos os tratamentos, com valores médios de 49,34%, 49,48% e 48,97% para os queijos controle e tratados com 100 UI.mL^{-1} e 500 UI.mL^{-1} de nisina, respectivamente.

Sobral (2012) encontrou um teor médio de gordura no extrato seco (GES) dos queijos Minas artesanais de Araxá de 48,5%, sendo classificado também como gordo pela portaria 146 (BRASIL, 1996). No mesmo trabalho, foram encontradas diferenças estatísticas nos valores obtidos, pois o queijo controle, com 100 IU.mL^{-1} e 400 IU.mL^{-1} de nisina apresentaram valores médios de porcentagem de gordura no extrato seco (GES) de 53,35%,

49,85% e 49,07% respectivamente. O autor observou que quanto maior a adição de nisina, menor o valores de GES encontrado. Diferindo do estudo de Sobral (2012), em um estudo realizado por Pinto et al. (2011) o teor de gordura dos queijos artesanais do Serro com 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ não apresentaram diferença significativa em relação ao queijo controle.

Quanto ao teor de proteínas, a adição de nisina no queijo coalho não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao queijo controle (Figura 5). Apesar da nisina ser um peptídeo, a quantidade adicionada não foi significativa para alterar os valores do conteúdo de nitrogênio presente nos queijos do trabalho em relação ao queijo controle.

Figura 5 – Teores médios de proteínas das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.



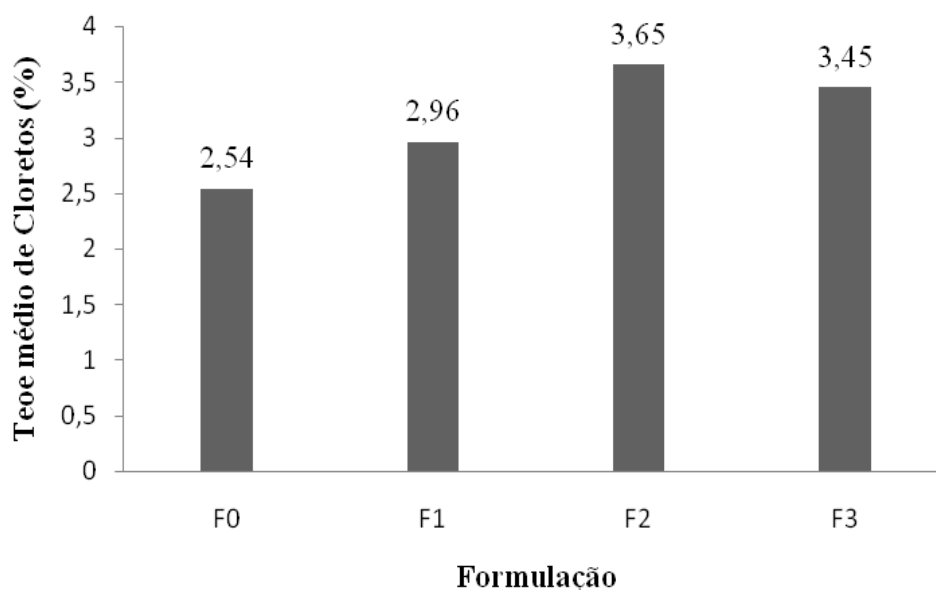
FONTE: Elaborada pela autora.

Nassu; Andrade; Silva (2006) caracterizando queijo coalho do Rio Grande do Norte encontraram valores médios de proteínas de 24,26%, valor superior ao encontrado neste trabalho. Silva et al. (2010), avaliando a influência dos procedimentos de fabricação nas características do queijo coalho, também encontrou valores superiores no conteúdo de proteína, com média de 28,65%. Sobral (2012) também não verificou efeito significativo das concentrações de nisina (100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹) em relação à proteína total dos queijos.

Na Figura 6 estão representados os valores do teor de cloretos encontrado nos queijos elaborados. Não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as formulações de queijo coalho produzidas com nisina e a formulação controle.

O teor de cloretos varia com o tipo de salga e com o teor de umidade, pois, quanto maior a umidade, maior a absorção e difusão de sal na massa (FURTADO, 1991). As características do leite utilizado também influenciam nos teor de cloretos dos queijos e outros produtos lácteos (SILVA, 2004).

Figura 6 – Avaliação do teor de cloretos (%) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.



FONTE: Elaborada pela autora.

Nos trabalhos de Teodoro (2012) e Sobral (2012) utilizando 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹; e 100 UI.mL⁻¹ e 400 UI.mL⁻¹ de nisina, respectivamente, não foram encontradas diferenças estatísticas no teor de cloretos dos queijos elaborados. Estes resultados e os resultados encontrados neste trabalho diferem dos resultados encontrados por Pinto et al. (2011), em queijo Minas do Serro, onde os queijos com 500 UI.mL⁻¹ apresentaram maior teor de cloretos se comparados aos queijos controle e com 100 UI.mL⁻¹ de nisina.

Na determinação de cor (Tabela 6), o parâmetro L* indica a luminosidade e se refere à capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, variando em uma escala de zero a 100. Houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos e os tempos de armazenamento.

Quanto maior o valor de L*, mais claro o objeto. O parâmetro a* refere-se à contribuição das cores verde(-)/vermelho(+) e o parâmetro b* às cores azul(-)/amarelo(+). Em geral, as amostras apresentaram alta luminosidade (L*), com predominância da cor amarela

(b*) sobre a cor vermelha (a*), cuja contribuição na cor foi muito pequena e com valores muito baixos, indicando a cor branca amarelada do produto, característica de queijo coalho.

As formulações não apresentaram diferenças significativas ao final do armazenamento para o fator L*, porém os maiores valores foram apresentados pelas formulações adicionadas de nisina. Para o parâmetro a*, os valores foram maiores para as formulações F0, F1 e F2, , mostrando menor influência da cor vermelha na formulação F3. No parâmetro b*, a formulação F0 apresentou maiores valores, evidenciando a cor amarela durante o armazenamento.

Tabela 6 – Valores médios de cor (L*, a* e b*) das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).

Formulação	L*			a*			b*		
	0	14	28	0	14	28	0	14	28
F0	84,4 bA	74,1 bB	74,9 aB	1,8 aB	3,2 aA	3,4 aA	27,6 aA	24,4 aA	26,1 aA
F1	83,1 bA	84,2 aA	75,2 aA	1,8 aB	3,1 abA	3,1 aA	24,4 aA	26,4 aA	20,5 bB
F2	73,7 cB	91,6 aA	85,3 aA	2,0 aB	2,7 abB	3,4 aA	17,9 bB	21,4 bA	24,1 aA
F3	92,5 aA	74,2 bB	79,9 aB	2,4 aA	2,0 bA	2,2 aA	19,8 bA	20,1 bA	18,8 bA

FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Sobral (2012) não observou efeito significativo das concentrações de nisina em relação à luminosidade dos queijos (L*) e ao parâmetro b*, mas houve efeito nos tempos de maturação ($p > 0,05$). Para o parâmetro a*, o autor observou efeito significativo das concentrações de nisina e do tempo de maturação dos queijos minas da região do Araxá ($p > 0,05$). Pinto et al. (2011) não encontraram diferença em nenhum dos parâmetros (L*, a* e b*) de cor dos queijos minas da região do Serro.

5.2 Características microbiológicas

A Tabela 7 apresenta os valores encontrados na análise de bactérias do grupo coliforme, sendo fornecidos os resultados de Coliformes Totais (NMP.g⁻¹), pois não foram encontrados resultados positivos para Coliformes Termotolerantes.

As formulações adicionadas de nisina (F1, F2 e F3) apresentaram contagens elevadas em relação ao controle, durante todo o período de armazenamento. A nisina não atua sobre gram negativos, dessa forma, não reduz ou impede a multiplicação de enterobactérias. Bactérias gram negativas são resistentes à nisina em função da composição lipopolissacarídica de sua membrana externa, que atua como barreira à ação de nisina na membrana

citoplasmática (ARAUZ et al. 2009). Isso contribui indiretamente para o aumento das contagens de Coliformes na medida em que inibe os micro-organismos gram-positivos, fazendo com que a competição entre esses micro-organismos diminua (TORNADIJO et al., 2001).

Tabela 7 – Contagem média de Coliformes Totais em NMP.g⁻¹, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).

Formulação	Período de Armazenamento (Dias)				
	0	7	14	21	28
F0	15	13	<3	<3	28
F1	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100
F2	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100
F3	>1100	>1100	>1100	>1100	210

FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

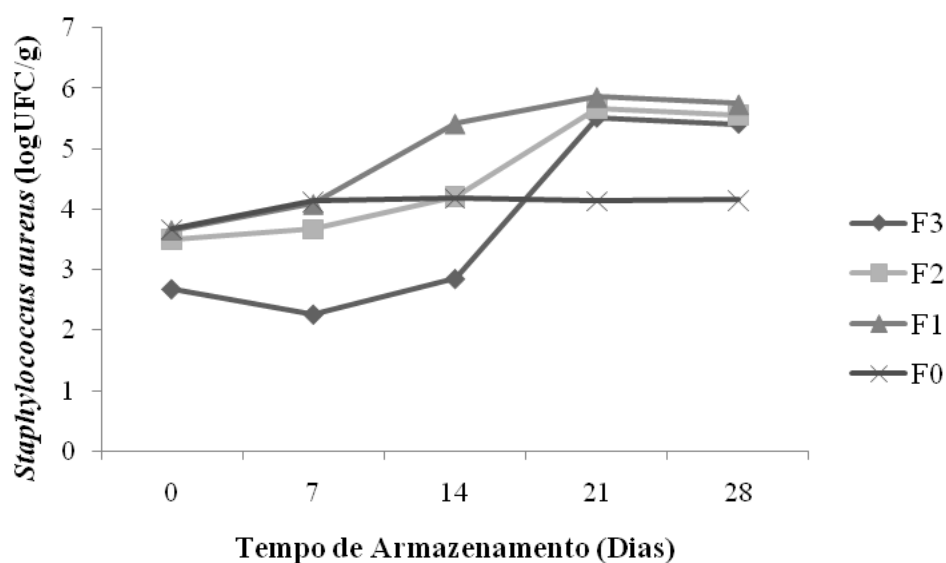
Teodoro (2012) observou que as contagens também foram inferiores nos queijos do grupo-controle ($p > 0,05$) quando comparadas aos queijos adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹ de nisina que, por sua vez, não diferiram entre si ($p \geq 0,05$). No trabalho de Sobral (2012) houve efeito significativo das concentrações de nisina e do tempo em relação à contagem de coliformes totais ($p > 0,05$), mas não houve efeito significativo da interação entre tempo e concentrações de nisina ($p \geq 0,05$). O autor observou que quanto maior a concentração de nisina, maior é a contagem de coliformes totais.

De acordo com estes resultados, o uso de nisina não garante a qualidade do queijo coalho, em relação à população de bactérias do grupo coliforme, fazendo necessário manter as condições de higiene e boas práticas na fabricação e na obtenção do leite.

Nas análises de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* foram observadas ausência destes micro-organismos em todas as formulações de queijo coalho elaborados. Márquez e Rojas (2007) observaram o efeito inibitório de 10 e 16,7 mg.kg⁻¹ de nisina em queijo branco tipo Telita fabricado na Venezuela. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e de *L. monocytogenes*. Nascimento; Moreno e Kuyae (2008) estudaram o espectro de ação da nisina sobre diferentes estirpes de *L. monocytogenes* e verificaram que a bacteriocina inibiu 100% da população nas concentrações de 200 a 400 UI.mL⁻¹. Além da utilização de substâncias antimicrobianas naturais, processos físicos como tratamento do leite com utilização de altas pressões constituem uma alternativa para redução do risco de contaminação de queijos por *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* (LINTON et al., 2008).

A Figura 7 mostra a curva de crescimento de *Staphylococcus aureus*, em logUFC.g⁻¹, nos queijos coalho adicionados de nisina. A quantidade de *Staphylococcus aureus* adicionados à massa do queijo correspondia a 10⁶ UFC.g⁻¹ pela escala McFarland (CHIODA et al., 2006), mas após a prensagem verificou-se que a contagem ficou entre os valores de 4,8x10² e 4,8x10³ UFC.g⁻¹ (Tabela 8).

Figura 7 – Crescimento de *Staphylococcus aureus*, em log UFC.g⁻¹, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28dias).



FONTE: Elaborada pela autora.

A formulação F3, com 12,5 mg.kg⁻¹ de nisina, apresentou contagens dentro dos limites estabelecidos pela legislação até 7 dias de armazenamento. Os valores das contagens dessa formulação foram inferiores e significativamente diferentes ($p > 0,05$) das demais formulações até 14 dias de armazenamento (Tabela 8). Houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos e os tempos de armazenamento.

A formulação controle (F0) apresentou contagens semelhantes à formulação com menor quantidade de nisina (F1) até os 7 dias de armazenamento, sem diferença significativa. A partir dos 21 dias, tempo superior ao estabelecido pela legislação para o armazenamento de queijo coalho, que são 10 dias (BRASIL, 2001), a formulação controle apresentou contagens de *S. aureus* inferiores às contagens das formulações adicionadas de nisina, sendo que estas não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 8 – Contagem média de *Staphylococcus aureus*, em UFC.g⁻¹, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).

Formulação	Período de Armazenamento (Dias)				
	0	7	14	21	28
F0	4,8x10 ³ aB	1,5x10 ⁴ aA	1,5x10 ⁴ bA	1,4x10 ⁵ bA	1,4x10 ⁴ bA
F1	4,7x10 ³ aD	1,4x10 ⁴ aC	2,7x10 ⁵ aB	6,9x10 ⁵ aA	6,3x10 ⁵ aA
F2	3,2x10 ³ aC	4,7x10 ³ bC	1,7x10 ⁴ bB	4,8x10 ⁵ aA	4x10 ⁵ aA
F3	4,8x10 ² bB	2,5x10 ² cC	7,2x10 ² cB	3,3x10 ⁵ aA	2,6x10 ⁵ aA

FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A diminuição do efeito bactericida da nisina a partir dos 14 dias de armazenamento (Figura 6) pode ter ocorrido devido ao desenvolvimento de resistência à nisina por uma mutação espontânea. Essa mutação ocasiona o surgimento de micro-organismos resistentes à bacteriocina em contato, fazendo com que estes sejam selecionados e se multipliquem mesmo na presença da nisina (VENEMA; VENEMA; KOK, 1995).

Teodoro (2012) verificou que as contagens de *S. aureus* dos queijos Minas Canastra foram significativamente afetadas pelo tratamento e durante o tempo de armazenamento, isoladamente. O controle apresentou números mais elevados de *S. aureus*, superiores aos encontrados para o tratamento com 100 UI.mL⁻¹ que, por sua vez, superou os valores do tratamento com 500 UI.mL⁻¹ de nisina. Os queijos foram avaliados durante tempos de maturação de 03, 07, 14, 30, 45, 60 dias, e os tratamentos diferiram entre si nos tempos 03 e 07 dias.

No trabalho de Pinto (2008) a redução nas contagens de *S. aureus* em queijo Minas do Serro foi diretamente proporcional à dose de nisina inoculada (100 IU.mL⁻¹ e 500 IU.mL⁻¹). Sobral (2012) não detectou a presença de *S. aureus* ao longo dos 60 dias de maturação do queijo Minas da região do Araxá adicionado de 100 e 400 UI.mL⁻¹ de nisina.

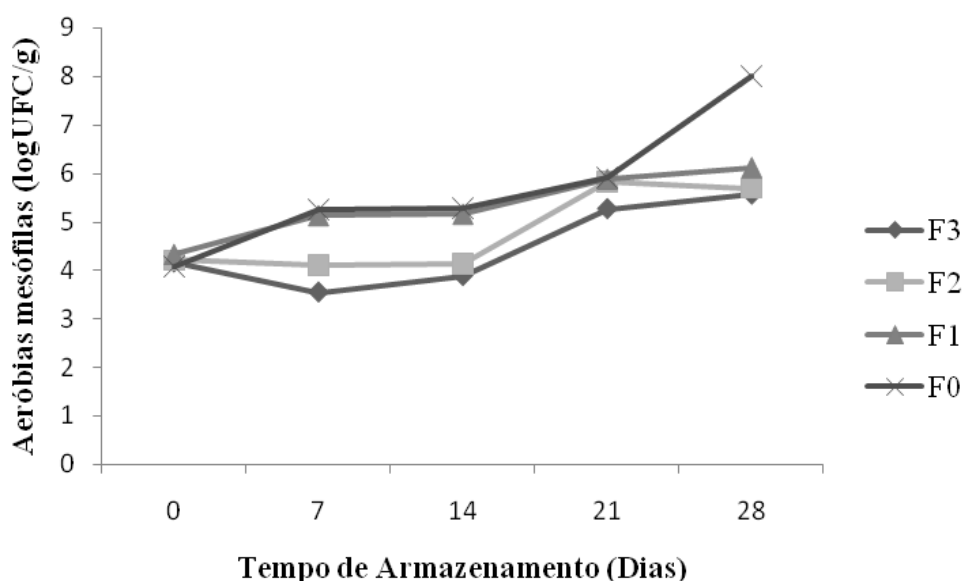
A Figura 8 mostra o crescimento de bactérias aeróbias mesófilas no queijo elaborado com nisina durante o período de armazenamento. Houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos e os tempos de armazenamento (Tabela 9). No dia da fabricação (0 Dias) não houve diferença estatística entre as formulações com nisina e o controle, demonstrando que a nisina não interferiu na população de bactérias aeróbias mesófilas durante o período de elaboração dos queijos coalho.

A partir dos 7 dias de fabricação a formulação F3 apresentou contagens de inferiores às demais formulações, sendo significativamente diferentes ($p > 0,05$) com 7 e 21

dias de armazenamento e com valores aproximados à formulação F2, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) com esta nos tempos 14 e 28 dias (Tabela 9).

Os resultados demonstram que quanto maior a quantidade de nisina aplicada, menores as contagens de bactérias aeróbias mesófilas. A nisina tem efeito bactericida no grupo de bactérias gram-positivas, sendo assim este efeito inibitório pode ter influenciado de maneira geral nas contagens de aeróbios mesófilos.

Figura 8 – Crescimento de bactérias aeróbias mesófilas, em log UFC.g⁻¹, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).



FONTE: Elaborada pela autora.

Tabela 9 – Contagem média de bactérias aeróbias mesófilas em log UFC.g⁻¹, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4° C/ 28 dias).

Formulação	Período de Armazenamento (Dias)				
	0	7	14	21	28
F0	4,07 aD	5,25 aC	5,28 aC	5,90 aB	8 aA
F1	4,32 aC	5,12 aB	5,15 aB	5,87 aA	6,11 bA
F2	4,20 aB	4,09 bB	4,12 bB	5,82 aA	5,68 cA
F3	4,16 aB	3,54 cC	3,88 bB	5,26 bA	5,56 cA

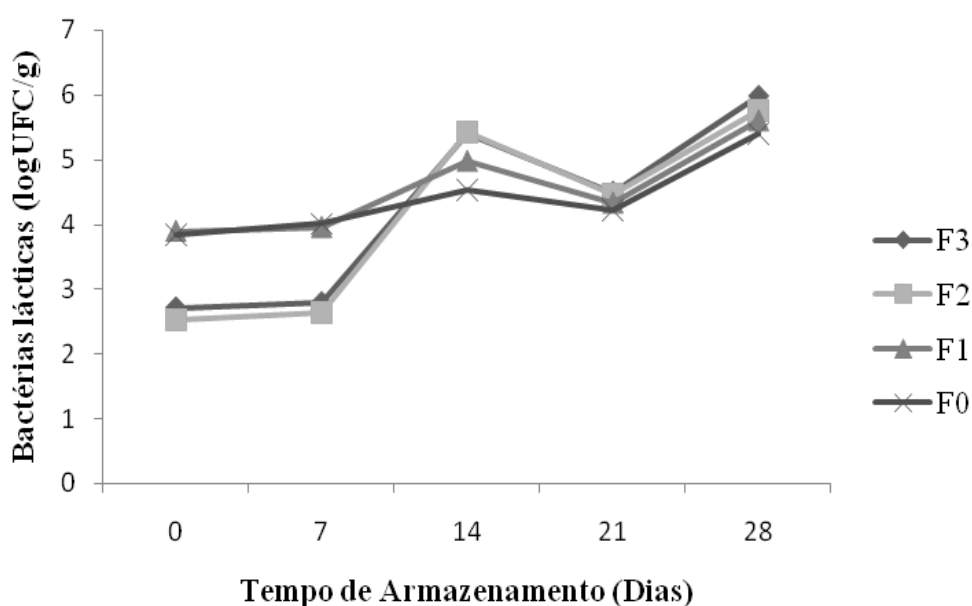
FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Sobral (2012) verificou que quanto maior foi a dose de nisina utilizada, menor foi a contagem de aeróbios mesófilos no queijo Minas da região do Araxá, indicando que a nisina inibiu este grupo de micro-organismos. Teodoro (2012) observou que as diferentes doses de

nisina (100UI.mL^{-1} e 500UI.mL^{-1}) não interferiram no desenvolvimento de bactérias aeróbias mesófilas, no queijo Minas Canastra. Al-Holy et al. (2012) estudando queijo branco fresco, com contagens iniciais de mesófilos aeróbios entre 5 e 6 log UFC.g⁻¹, verificaram que a nisina na concentração de 500UI.mL^{-1} também não apresentou efeito sobre suas contagens em relação ao controle.

A Figura 9 apresenta os crescimento de bactérias lácticas do queijo elaborado com nisina durante o período de armazenamento. Durante os primeiros dias de armazenamento (0 e 7 dias) as contagens de bactérias lácticas eram inferiores nos queijos F2 e F3, as formulações com maiores quantidades de nisina, sendo estas significativamente diferentes ($p > 0,05$) das formulações F0 e F1 durante todo o período de armazenamento (Tabela 10).

Figura 9 – Crescimento de bactérias lácticas, em log UFC.g⁻¹, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).



FONTE: Elaborada pela autora.

A nisina é uma bacteriocina capaz de inibir a multiplicação de bactérias Gram positivas (CLEVELAND et al., 2001; ARQUÉS et al., 2011), podendo, portanto, reduzir as contagens de bactérias lácticas. Estas bactérias fazem parte da microbiota normal de queijos, oriundas do leite cru ou adicionadas através do fermento lácteo. Possuem papel fundamental na formação do sabor e do aroma dos queijos, além de influenciar na textura (HERREROS et al., 2007; DAL BELLO et al., 2010). Desta forma, qualquer fator que interfira no seu desenvolvimento poderá acarretar em um produto final descaracterizado, com propriedades sensoriais alteradas.

Kykkidou et al. (2007) verificaram que diferentes concentrações de nisina (0, 50 e 150 UI.g⁻¹) afetaram a contagem de lactococos somente após 14 dias de maturação do queijo Galotyri sob refrigeração a 4 °C. Após 14 dias, quanto maior a dose de nisina, menor foi a população de lactococos. Já a população de lactobacilos decresceu até 21 dias de maturação, observando que quanto maior a concentração de nisina, menor a população de lactobacilos.

Tabela 10 – Contagem média de bactérias lácticas, em log UFC.g⁻¹, das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina ao longo do armazenamento (4 °C/ 28 dias).

Formulação	Período de Armazenamento (Dias)				
	0	7	14	21	28
F0	3,84 Ab	4,01 aB	4,53 bC	4,22 aB	5,40 bA
F1	3,89 aD	3,95 aD	4,98 bB	4,33 aC	5,61 bA
F2	2,52 Bc	2,64 bC	5,42 aA	4,46 aB	5,76 aA
F3	2,71 Bd	2,79 bD	5,41 aB	4,50 aC	5,98 aA

FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) e pela mesma letra maiúscula (linha) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Diferentemente deste trabalho, Teodoro (2012) observou que as contagens dos três tratamentos (0; 100 UI.mL⁻¹ e 500 UI.mL⁻¹) de nisina no queijo Minas Canastra foram estatisticamente iguais até o final da maturação, o que demonstra que a nisina não interferiu nas contagens dos queijos minas canastra. Sobral (2012) não verificou diferença significativa das concentrações de nisina, do tempo e da interação do tempo e concentrações de nisina em relação à contagem de bactérias lácticas nos queijos Minas da região do Araxá.

5.3 Análise sensorial

5.3.1 Teste de diferença

O teste de ordenação foi usado para comparar a textura das diferentes formulações de queijo coalho adicionadas de nisina. A Tabela 11 apresenta a somatória das ordens obtidas no teste para cada formulação. Pela Tabela de Christensen et al. (2006), a diferença mínima significativa (DMS) entre os totais de ordenação ao nível de 5% de significância é de 25. Assim, todas as amostras que diferem entre si por um valor maior ou igual a 25 são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) quanto à textura.

Tabela 11 – Somatório dos julgamentos obtidos no teste de ordenação das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.

Formulações	Valores
F0	146 a
F1	122 a
F2	138 a
F3	74 b

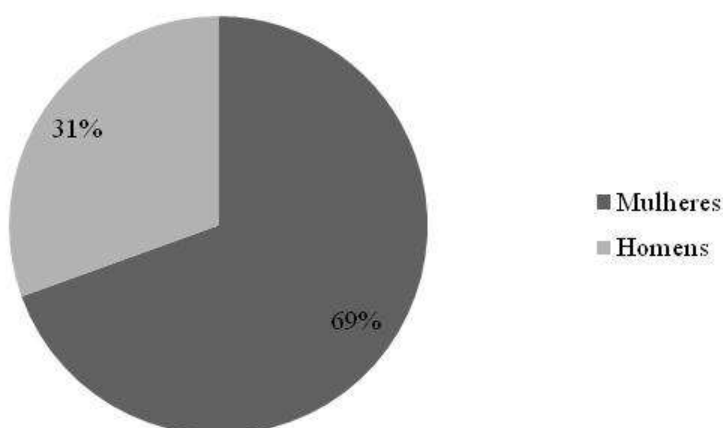
FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si de acordo com a Tabela de Christesen (CHRISTESEN et al., 2006) ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 11, podemos considerar que as formulações de queijo coalho F0, F1 e F2 diferem significativamente ($p \leq 0,05$) da formulação F3, sendo esta significativamente mais macia que as demais. Portanto, a adição de nisina em queijo coalho em uma concentração de 12,5 mg.kg⁻¹ promove alterações em sua textura, deixando-o mais macio.

5.3.2 Teste de aceitação

Os provadores que realizaram o teste de aceitação foram identificados quanto ao sexo e faixa etária. Participaram dos testes sensoriais 120 provadores, nos quais 69% eram do sexo feminino e 31 % do sexo masculino, conforme mostra a Figura 10.

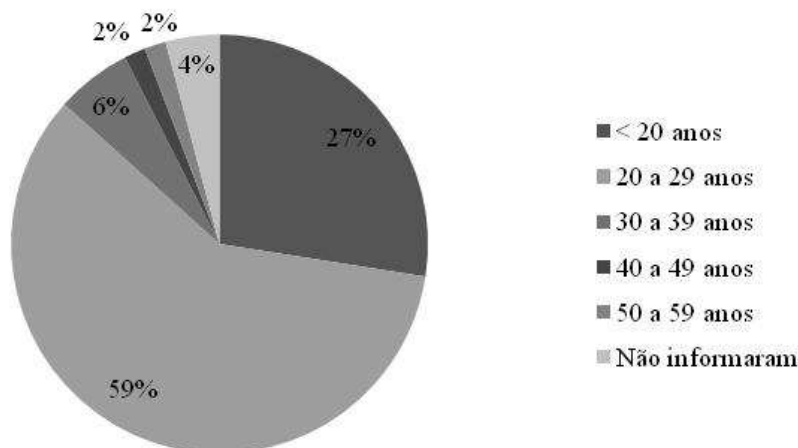
Figura 10 – Porcentagem de provadores das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina em relação ao sexo.



FONTE: Elaborada pela autora.

De acordo com a Figura 11, do total de provadores que realizaram o teste, 27% pertenciam à faixa etária < 20 anos; 59% estavam na faixa de 20 à 29 anos; 6% entre 30 e 39 anos; 2% entre 40 e 49 anos e 2% entre 50 e 59. Do total, 4% não informaram a idade.

Figura 11 – Porcentagem de provadores das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina em relação à faixa etária.



FONTE: Elaborada pela autora.

A Tabela 12 mostra as médias dos valores atribuídos no teste de aceitação para as formulações de queijos elaborados adicionados de nisina e o controle. Foram avaliados os atributos aparência, aroma, sabor e impressão global.

Tabela 12 – Médias dos valores de aceitação para os atributos avaliados pelos provadores das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.

Formulação	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão Global
F0	7,36 b	6,70 b	6,90 b	7,10 b
F1	7,75 a	7,25 a	7,48 a	7,66 a
F2	7,72 a	7,09 a	7,32 a	7,49 a
F3	7,58 ab	7,06 a	7,42 a	7,60 a

FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹. **As médias seguidas pela mesma letra minúscula (coluna) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A formulação controle (F0) diferiu significativamente ($p > 0,05$) e com notas menores em relação às outras formulações (F1, F2 e F3), exceto na aparência, característica em que esta formulação não apresentou diferença significativa em relação à formulação F3. Este resultado indica que a nisina promoveu alterações sensoriais que agradaram o paladar dos provadores, pois os valores atribuídos às formulações adicionadas de nisina foram maiores do que aqueles atribuídos a formulação controle, sem adição de nisina. Essa diferença

sensorial pode estar relacionada aos índices de pH (Tabela 4), que são maiores, mas sem diferença significativa, nas formulações adicionadas de nisina, tornando o queijo menos ácido e sensorialmente mais aceito pelo provador.

5.3.3 Índice de aceitabilidade

Verificou-se que as formulações obtiveram boa aceitabilidade em relação à todos os atributos avaliados, apresentando índices superiores à 70%. A tabela 13 apresenta o índice de aceitabilidade (IA) geral da formulações de queijo coalho para os atributos de aparência, aroma, sabor e impressão global.

Tabela 13 – Índice de aceitabilidade das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina.

Formulação	Índice de aceitabilidade (%)			
	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
F0	81,7	75,1	76,6	78,8
F1	86,1	80,5	83,1	85,1
F2	85,7	78,7	81,3	83,2
F3	84,2	78,4	82,4	84,4

FONTE: Elaborada pela autora. *F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹.

Um índice de aceitabilidade maior que 70% indica que o produto foi aceito, de acordo com Dutcosky (2013). A formulação F0 apresentou menores valores de IA em todos os atributos, indicando uma melhor aceitabilidade dos provadores pelas formulações adicionadas de nisina (F1, F2 e F3). Esses resultados mostram que a utilização da nisina no queijo coalho melhoraria a aceitabilidade ao produto pelo consumidor.

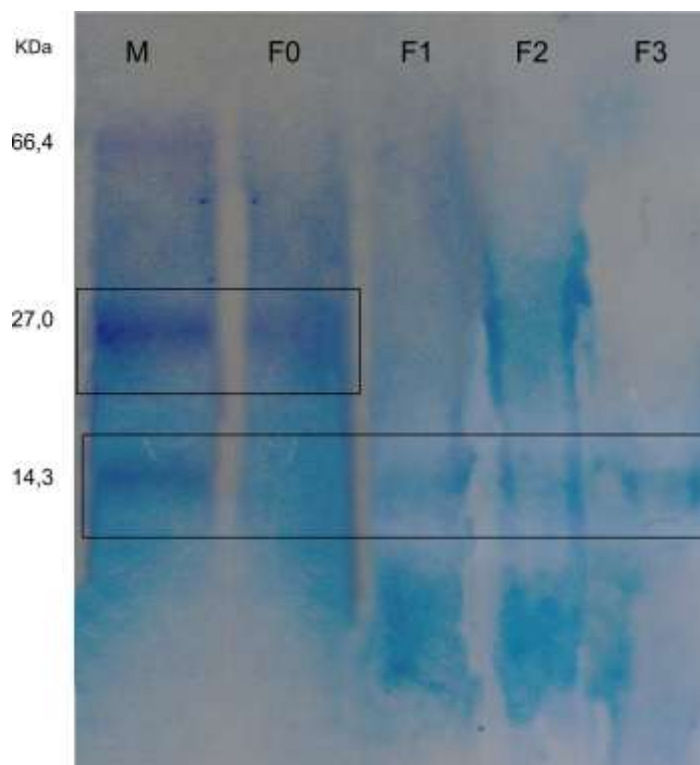
5.4 Eletroforese (SDS-PAGE)

Foi desenvolvida a técnica de gel de poliacrilamida na presença de Dodecilsulfato de Sódio (SDS-PAGE) para comparação do perfil eletroforético dos queijos elaborados com e sem nisina. A Figura 12 apresenta a padrão protéico obtido pela eletroforese (SDS-PAGE) das formulações de queijo coalho corado com nitrato de prata. Na coloração com azul de Coomassie não foi possível observar o padrão protéico.

Os resultados mostram que a adição de nisina no queijo coalho alterou o perfil protéico do mesmo. A formulação F0 apresentou perfil eletroforético diferente das demais formulações, com uma banda de maior peso molecular (27,0 kDa). Essa banda corresponde à

caseína, proteína mais abundante no leite, e consequentemente no queijo (YADA, 2004). Sua ausência nas formulações adicionadas de nisina pode ser um indício que a mesma sofreu proteólise, provavelmente durante o processo de coagulação, em frações menores (α -caseína, β -caseína e κ -caseína).

Figura 12 – Comparação eletroforética das proteínas das formulações de queijo coalho com diferentes concentrações de nisina, em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) corado com nitrato de prata.



FONTE: Elaborada pela autora. *M: Marcador de peso molecular; F0: 0 mg.kg⁻¹; F1: 3 mg.kg⁻¹; F2: 6 mg.kg⁻¹; F3: 12,5 mg.kg⁻¹.

As formulações F1, F2 e F3 apresentaram no gel de poliacrilamida uma banda com peso molecular de 14,3 kDa que não foi observada na formulação F0. A segunda proteína mais abundante no leite é a α -Lactoalbumina. A molécula consiste em 123 aminoácidos e tem uma massa molar de 14,2 kDa (YADA, 2004). Essa proteína foi verificada no gel nas formulações F1, F2 e F3, estando ausente na formulação controle, F0.

A molécula da nisina apresenta baixo peso molecular, com apenas 3,5 kDa (PAPAGIANNI, 2003). Não foram observadas bandas correspondentes ao peso molecular da nisina, o que pode ser explicado pela baixa quantidade da mesma adicionada no queijo, não sendo suficiente para sua observação por eletroforese em gel de poliacrilamida.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Os queijos adicionados de nisina não apresentaram diferenças do controle para os parâmetros umidade, gordura , proteínas e cloretos.
- ✓ O trabalho corroborou a ineficiência da nisina em bactérias gram negativas através do crescimento de coliformes totais durante o armazenamento nas formulações adicionadas de nisina.
- ✓ A nisina foi eficiente no controle de *Staphylococcus aureus*, mantendo-os dentro dos limites preconizados pela legislação até os 14 dias de fabricação, período superior ao prazo de validade.
- ✓ Os queijos coalho elaborados não apresentam as bactérias *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, como preconizados na legislação.
- ✓ A nisina foi eficiente no controle de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas, sendo essa contagens sempre inferiores à formulação controle.
- ✓ A nisina alterou a textura dos queijos coalho, observada através do teste sensorial de diferença por ordenação entre as formulações. A análise sensorial também apontou maior aceitabilidade para o queijo coalho adicionado de nisina.
- ✓ O perfil eletroforético foi alterado pela adição de nisina, mostrando proteínas com maior peso molecular na formulação controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HOLY, M. A.; AL-NABULSI, A.; OSAILI, T. M.; AYYASH, M. M.; SHAKER, R. R. Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. **Food Control**, v. 23, p. 48-53. 2012.
- ALTENA, K.; GUDER, A.; CRAMER, C.; BIERBAUM, G. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2565-2571, 2000.
- ALVES, V. F.; MARTINEZ, R. C. R.; LAVRADOR, M. A. S.; DE MARTINIS, E.C.P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, v. 74, p. 623-627, 2006.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17th ed., Gaithersburg: Ed. William Horwitz, 2002.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2001. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 676 p.
- ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in food Science and Technology**. v. 20, p. 146-154, 2009.
- ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of foodborne pathogens in milk. **Food Control**, v. 22, p. 457- 461. 2011.
- BACHMANN, H. P.; FRÖHLICH-WYDER, M. T.; JAKOB, E.; ROTH, E.; WECHSLER, D. Raw milk cheeses. In: **Encyclopedia of Dairy Science**. London: Elsevier, p. 652-660, 2011.
- BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; GHALFI, H.; ELMEJDOUB, T.; ROBLAIN, D.; JACQUES P.; THONART, P. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in model cultured milk by in situ bacteriocinproduction from *Lactococcus lactis lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, p. 145-151, 2002.
- BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. Portaria no 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 3977-3986, 11 de março de 1996. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Inst. Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da União Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jun 2001, Seção 1, 13p.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre

Listeria monocytogenes em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 135-144, 2006.

CASTRO, M. P.; PALAVECINO, N. Z.; HERMAN, C.; GARRO, O. A.; CAMPOS, C. A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, v. 87, p. 321- 329, 2011.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento de queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 205-214, 2007.

CHIODA, T. P.; SCHOCKEN-ITURRINO; R. P.; GARCIA, G. R.; MACRI, S. F; TROVO, K. P., MEDEIROS, A. A. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 121-124, 2006.

CHRISTENSEN, Z. T.; OGDEN, L. V.; DUNN, M. L.; EGGETT, D. L. Multiple comparison produres for analysis of ranked data. **Journal of Food Science**, v.71, p. S132-S143, 2006.

CIE - Commission Internationale de l'Éclairage. **CIE 15.2: Colorimetry**. 2ª ed., Central Bureau of the CIE, Vienna, Austria, 1986. 74p.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E. Review: bacteriocin of lactic acid bacteria. **Food Science Technology International**, v. 7, p. 281-305, 2001.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

COTTER, P. C.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

DABES, A. C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E. M.. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 136-140, 2001.

DAL BELLO, B.; RANTSIOU, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R.; CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1151-1159. 2010.

DANTAS, D. S. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 2012.

DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DEGNAN, A. J.; BUYONG, N.; LUCHANSKY, J. B. Antilisterial activity of pediocin AcH model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p.127-138, 1993.

DELGADO, A.; LOPEZ, F. N. A.; BRITO, D.; PERES, C.; FEVEREIRO, P.; GARRIDOFERNANDEZ, A. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology**. v. 130, p. 193-201, 2007.

DE VUYST, L. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* spp. *lactis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 287-292, 1994.

DUARTE, D. A. M. **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco**. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

DURR, J. W. **Como produzir leite com qualidade**. 2.ed. Brasília: SENAR, 2007. 36 p.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4a ed. rev. e ampl. Curitiba: Champagnat, 2013. 531 p.

ECKNER, K. F. Bacteriocins and food applications. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 12, p. 204-209, 1992.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 932-939, 2006.

FRAZER, A. C.; SHARRATT, M.; HICMAN, J. R. The biological effects of food additives. I. Nisin. **Journal of Science and Food Agricultural**, v.13, p. 32-42, 1962.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, suplemento, p. 162-165, 2003.

FOEGEDING, P. M.; THOMAS, A. B.; PILKINGTON, D. H.; KLAENHAMMER, T. R. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 884-890, 1992.

FOGAÇA, D. N. L.; SILVA, W. S.; SANTOS JUNIOR, H. C. M.; RODRIGUES, L. B. Avaliação do efeito do armazenamento refrigerado sobre o perfil de textura de queijo de coalho condimentado com tomate seco. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 4, p. 133-137, 2012.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; SWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Maryland: Aspen Publication, 2000. 587 p.

FURTADO, D. N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra.** São Paulo, 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo.** São Paulo: Globo, 1991. 297 p.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p. 51-70, 2007.

GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, A. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 151-155. 2010.

GREEN, G.; DICKS, L. M.T.; BRUGGEMAN, G.; VANDAMME, E.J.; CHIKINDAS, M.L. Pediocin-PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. **Journal Applied Microbiology**, v. 83, p. 127-132, 1997.

HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 105-108, 2007.

HERREROS, M. A.; ARENAS, R.; SANDOVAL, M. H.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 328–335. 2007.

HOLZAPFEL, W. H., GEISEN, R.; CHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protetive cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

HOOVER, D. G.; STEENSON, L.R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** San Diego: Academic Press, 1993. 274 p.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.

IVANOVA, I.; KABADJOVA, P.; PANTEV, A.; DANOVA, S.; DOUSSET, X. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza – bulgarian traditional cereal beverage. **Biocatalysis - 2000: Fundamentals & Applications**, v. 41, Suplemento, p. 4753, 2000.

JEEVARATNAM, K; JAMUNA, M; BAWA, A. S. Biological preservation of foods– Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 446-454, 2005.

KYKKIDOU, S., POURNIS, N., KOSTOULA, O. K., SAVVAIDI, I. N.. Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4 °C. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1254-1258, 2007.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 702-709, 2005.

LEROY, F.; VUYST, L. D. Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 65, p. 143-149, 2010.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 63-76, 2003.

LIMA, C. P. **Resistência de bactérias lácticas a bacteriófagos isolados na produção de queijos de coalho no Ceará**. 2010. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LINTON, M.; MACKLE, A. B.; UPADHYAY, V. K.; KELLY, A. L.; PATTERSON, M. F. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 423-428, 2008.

LIU, W.; HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2551-2558, 1990.

LÓPEZ-DÍAZ, T.M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, p. 23-32, 2000.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; JUNIOR, F. N. P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do serro, minas gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 516-521, 2004.

MARTINIS, E. C. P. de; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p. 191-208, 2002.

MÁRQUEZ, J. G.; ROJAS, C. E. G. Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 27, p. 108-111, 2007.

McMULLEN, L. M.; STILES, M. E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal of Food Protection**, vol. supplement, p. 64-71, 1996.

MELLO, M. B.; SILVA, G. P. F.; SANT'ANNA, V.; JANTZEN, M. M.; MOTTA, A. S. Avaliação da inativação térmica da pediocina *in vitro* e no alimento. XIX ENPOS. II **Mostra científica**, Pelotas – RS. 2010.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus* sp.** 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MELO, R. N.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, p. 321-338, 2005.

MORAES, D. A. **Otimização da produção de nisina em meio sintético.** 2002. 185f. Tese. (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, p. 163-167, 2003.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 54-63, 1996.

NASCIMENTO, M. S. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas frescal.** 2007. 184p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, L.; KUYAE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 120-127, 2008.

NASSU, R. T.; ANDRADE, A. S. A.; SILVA, A. C. Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 61, p. 303-305, 2006.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. A. **Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte.** Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2003. 24 p. (EMBRAPA/CNPAT. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Higiene alimentar**, v. 15, p. 28-36, 2001.

NEL, H. A.; BAUER, R.; VANDAMME, E. J.; DICKS, L. M. T. Growth optimisation of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD1. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 1131-1138, 2001.

NIELSEN, J. W.; DICKSON, J. S.; CROUSE, J. D.. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2142-2145, 1990.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: fundamentos tecnológicos.** Editora da Unicamp, Ícone editora. São Paulo, 1986. 146 p.

OLIVEIRA, W. S. Caracterização físico-química do queijo coalho produzido no município de Jaguaribe, Ceará. In: **Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Agroindústria**

Tropical, 2010, Fortaleza. Anais do Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Agroindustria Tropical. Fortaleza, v.1, p.57-57, 2010.

ORTOLANI, M.B.T. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo Minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

O'SULLIVAN, L.; MORGAN, S. M.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins: changes in cheese flora and flavour. In: WEIMER, B. C. (Ed.). **Improving the flavour of cheese**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. cap. 15, p. 326-342.

PAGANI, A. A. C.; SANTANA, M. M.; ALEXANDRE, A. P. S.; SILVA, E. A. da; SILVA, G. F. da. Aplicação de biopelículas pigmentadas em queijo de coalho. **Revista GEINTEC**, v. 3, p.41-47. 2012.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**. v. 21, p. 465 - 499, 2003.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 521-542, 2007.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial, qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, p. 63-70, abr. 2001.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27, p. 293-300, 2004.

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de Coalho comercializado no município de Campinas, SP**. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PINTO, M. E. R. **Estudo da ação antibacteriana da nisina**. 1996. 207f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 1996.

PINTO, M. S., CARVALHO, A. F., PIRES, A. C. S., SOUZA, A. A. C., SILVA, P. H. F., SOBRAL, D., PAULA J. C. J., SANTOS, A. L.. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 90-96, 2011.

QUEIROGA, R.C.R.E.; GUERRA, I.C.D.; OLIVEIRA, C.E.V.; OLIVEIRA, M.E.G.; SOUZA, E.L. Elaboração e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de queijo “tipo minas frescal” de leite de cabra condimentado. **Revista de Ciências Agrônômicas**, v.40, p.363-372, 2009.

RAY, B. Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. **ASM News**, v. 59, p. 285-291, 1993.

- RIBEIRO DE SÁ et al. Perfil microbiológico do queijo minas frescal comercializado no município de Uberlândia-MG. **Higiene Alimentar**, v. 17, p. 169, 2003.
- ROSEC, J. P.; GUIRAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.
- RODRIGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; GAYA, P.; NÚÑEZ, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.131-137, 2001.
- ROSA, M. C.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde Revista Científica**. v. 1, p. 09-15, 2002.
- SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T; BASSOLE, I. H .N; TRAORE, S.A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 678-683, 2006.
- SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1517-1522, 2008.
- SANTOS JÚNIOR, H. C. M.; SILVA, W. S.; FOGACA, D. N. L.; RODRIGUES, L. B. Análise do perfil de textura de queijos de coalho condimentado com carne seca durante o tempo de armazenagem sob refrigeração. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 4, p. 117-122, 2012.
- SANTOS, M. V. **Manejo de ordenha e qualidade do leite**. São Carlos: SENAR/EMBRAPA, 2006.
- SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos de coalho comercializados em Recife-PE**. 2000. 75f. Tese (Doutorado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008.
- SILVA, F. A. S. **Assistência Estatística**. Assistat versão 7.7 beta. Atualizado em janeiro de 2014. Registro INPI: 0004051-2. Departamento de Engenharia Agrícola - Centro de Tecnologia e Recursos Naturais - Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, Brasil.
- SILVA JUNIOR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 2002. 623 p.
- SILVA, M. C. D.; RAMOS, A. C. S.; MORENO, I.; MORAES, J. O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 214-221, 2010.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Juiz de Fora: Templo, v. 1, 2004, 124 p.

SOBRAL, D. **Efeito da nisina na contagem de *Staphylococcus aureus* e características do queijo minas artesanal da região de Araxá**. 2012. 116f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

STEVENS, K. A.; KLAPES, N. A.; SHELDON, B. W.; KLAENHAMMER, Y. R. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1786-1788, 1992.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. D. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.166-172, 2007.

TEODORO, V. A. M.. **Efeito da nisina na multiplicação de *Staphylococcus aureus* e nas características físico-químicas, reológicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra – MG**. 2012. 138f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

TORNADIJO, M. E.; GARCÍA, M. C.; FRESNO, J. M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 499-509. 2001.

VAN DE GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 187-216, 2002.

VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 36, p. 64-71, 2009.

VENEMA, K.; VENEMA, G.; KOK, J. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 299-304, 1995.

YADA, R. Y. **Protein in food processing**. Series in food science and technology. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.

YEZZI, T.L.; AJAO, A.B.; ZOTOLLA, E.A. Increased nisin in Cheddar-type cheese prepared with pH control of the bulke starter cultures system. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2827-2831, 1993.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p 862-867 , 2007.

ZHOU, L.; DING, Y.; CHEN, W.; ZHANG, P.; CHEN Y, E. The in vitro study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. **Oral Diseases**. v. 19, p. 494-500, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Ficha do teste de diferença por ordenação

Sexo: () F () M

Data: ____/____/____

Faixa etária: () < 20 anos () 20 a 29 anos () 30 a 39 anos () 40 a 49 anos () 50 a 59 anos () > 60 anos

Dureza é a força necessária para romper uma substância entre os dentes molares (alimentos sólidos) ou entre a língua e o palato (alimentos semissólidos).

Você está recebendo quatro amostras codificadas de queijo coalho adicionadas de nisina. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita e coloque-as em ordem crescente de dureza.

- duro

+ duro

Comentários: _____

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ MESTRADO ACADÊMICO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

BIOCONSERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO COALHO ELABORADO COM NISINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: Bioconservação e caracterização do queijo coalho elaborado com nisina.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Gilnara Lima Bandeira

O Sr (a) está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa que irá investigar a aceitação de queijo coalho adicionado de nisina. O presente trabalho visa analisar a aceitação deste produto.

1. PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA: Ao participar desta pesquisa o Sr. (a) será submetido (a) à provar as amostras e irá responder sobre a aceitação deste produto. Lembramos que sua participação é voluntária, e tem a liberdade de não querer participar, e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado a avaliação.

2. RISCOS E DESCONFORTOS: O procedimento utilizado não é adequado para pessoas portadoras de intolerância à lactose.

3. BENEFÍCIOS: Os benefícios esperados com o estudo são no sentido de estudar a influência da adição da nisina no queijo coalho.

4. FORMAS DE ASSISTÊNCIA: Se o (a) Sr. (a) precisar de alguma orientação por se sentir prejudicado (a) por causa da pesquisa, poderá se encaminhar à responsável da pesquisa para esclarecimentos e /ou posicionamentos pertinentes ao prejuízo.

5. CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações que o (a) Sr. (a) nos fornecer ou que sejam conseguidas por avaliações e entrevistas serão utilizadas somente para esta pesquisa. As respostas, dados pessoais ficarão em segredo e o seu nome não aparecerá em lugar nenhum dos formulários, nem quando os resultados forem apresentados.

6. ESCLARECIMENTOS: Se o (a) Sr. (a) tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

Nome do pesquisador responsável: Maria Gilnara Lima Bandeira

Endereço: Estevam Remígio, 1145

Telefone para contato: (88) 99805-7487 / E-mail: gilnarabandeira@gmail.com

Se desejar obter informações sobre os seus direitos e os aspectos éticos envolvidos na pesquisa poderá consultar a Coordenação do Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos – IFCE, Campus Limoeiro do Norte – CE.

Coordenação do Curso de Mestrado – IFCE, Campus Limoeiro do Norte - CE.

Rua Estevam Remígio, 1145, Bairro Centro.

CEP 62930-000

Telefone (88) 3447-6400

7. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS: Caso aceite participar da pesquisa, não receberá nenhuma compensação financeira.

8. CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO: Se o (a) Sr. (a) estiver de acordo em participar, o Sr.(a) deverá preencher e assinar o Termo de Consentimento Pós-esclarecido que se segue, e receberá uma cópia deste Termo.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador(a) da cédula de identidade _____, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em autorizar sua participação voluntária nesta pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Limoeiro do Norte-CE. _____ de _____ de _____

Assinatura do participante



Impressão dactiloscópica

Assinatura do Pesquisador

ANEXO C – Ficha do teste de aceitação e intenção de compra

SEXO: () Masculino () Feminino

DATA: __/__/__

FAIXA ETÁRIA: () < 20 anos () 20 - 29 anos () 30 - 39 anos () 40 - 49 anos () 50 – 59 anos

Teste Sensorial – Escala Hedônica

Você está recebendo quatro amostras queijo coalho adicionado de nisina. Por favor, prove-as da esquerda para a direita e atribua uma nota para cada parâmetro de acordo com a escala abaixo relacionada.

- 9 – gostei extremamente
- 8 – gostei muito
- 7 – gostei moderadamente
- 6 – gostei ligeiramente
- 5 – não gostei, nem desgostei
- 4 – desgostei ligeiramente
- 3 – desgostei moderadamente
- 2 – desgostei muito
- 1 – desgostei extremamente

AMOSTRAS	APARÊNCIA	AROMA	SABOR	IMPRESSÃO GLOBAL

Agora indique, utilizando a escala abaixo, a sua atitude de compra em relação às amostras:

- () Certamente compraria
- () Provavelmente compraria
- () Tenho duvidas se compraria
- () Provavelmente não compraria
- () Certamente não compraria